



**Universidad del Bío-Bío  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Ciencias Básicas  
Bachillerato en Ciencias**

**“COMPLEJOS DE HIERRO II DE QUITOSANO COMO  
INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA  
ESFINGOMIELINAZA C EN ERITROCITOS”.**

**Alumna: RIQUELME LAGOS ALEJANDRA**

**Profesor guía: Caro Díaz Claudia**

**Diciembre de 2014**



**Universidad del Bío-Bío  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Ciencias Básicas  
Bachillerato en Ciencias**

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL GRADO DE BACHILLER EN CIENCIAS.

**Diciembre 2014**

## INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Marco teórico.....	3
➤ Esfingomielinasa.....	3
➤ Quitosano.....	4
➤ Organización de la membrana de Eritrocito.....	4
➤ Mecanismo de Acción y Tratamiento.....	6
Metodología.....	7
➤ Preparación de la muestra.....	7
➤ Cuantificación.....	8
Resultados y Discusión.....	9
➤ Eritrocitos en presencia de complejos de quitosano.....	9
➤ Eritrocitos en presencia de complejos de quitosano y la enzima...	12
Conclusión.....	13
Bibliografía.....	14

## **Resumen**

El objetivo principal de este proyecto de tesis es estudiar exhaustivamente la interacción entre moléculas de quitosano y derivados del mismo (sintetizados y caracterizados en el laboratorio de recursos naturales) y eritrocitos. El complejo que presente menos daño a los eritrocitos será testado frente a la esfingomielinasa C, isómero de la esfingomielinasa D toxina producida por la araña de rincón (*Loxosceles*). Este veneno es suficientemente fuerte para causar severo daño a la víctima como dermonecrosis y se encuentra solo en estas arañas y en algunas bacterias patogénicas.

Para este propósito el procedimiento analítico incluye un conteo de eritrocitos a distintos tiempos en presencia de los complejos de quitosano, sólo el complejo sustituido con el grupo metil (-CH<sub>3</sub>) mostró ser el más inofensivo frente a los eritrocitos, por lo que fué testado con la enzima y parece interactuar con ésta protegiendo a los eritrocitos de una hemólisis. Esta interacción puede deberse a que el complejo oxida algún grupo externo de la toxina cambiando así su estructura y por lo tanto la cinética típica de la esfingomielinasa C frente a las células.

## **I. Introducción**

Arañas de gran interés médico en el mundo son del tipo Phoneutria, Loxosceles, Latrodectus y Atrax. El tipo Loxosceles es una araña rural y urbana más conocida como araña de rincón que inyecta la esfingomielinasa D (fosfolípido de 35 KD), proteína tóxica de alto peso molecular que induce a un incremento en la secreción de transmisores desde los terminales pre-sinápticos de los nervios afectados produciendo dolor local e inflamación en los ganglios linfáticos. Induce la activación de canales catiónicos no específicos en la membrana pre-sináptica como un resultado de su enlace a un receptor específico de la membrana. El veneno de esta araña café puede causar dermonecrosis, coagulopatias, insuficiencia renal, y muerte. [1]

Estudios electroquímicos han demostrado que los complejos de quitosano de Hierro sustituidos con un grupo salicilaldehídos cuando el sustituyente es el grupo metil hay una oxidación de algún grupo externo de la esfingomielinasa, sin embargo cuando el sustituyente es hidrógeno, metoxi, flúor, cloro, nitro y bromo no se observa esta oxidación. Un conteo de eritrocitos en presencia del complejo de quitosano y la toxina debería demostrar que el complejo sustituido con el grupo metil provoca menor muerte celular, corroborando una interacción entre el grupo metil y algún grupo externo de la toxina.

El hecho de utilizar complejos de quitosano se debe a que este polímero ha sido investigado extensamente ya que puede incluir en su estructura drogas con diferentes características físico-químicas [2,3]. El uso de éste polímero en diferentes campos ha sorprendido enormemente especialmente como inmovilizante de ciertas sustancias [4-7] y como aditivo alimentario debido a que es biodegradable.

En esta tesis se realizarán estudios que comprenden el conteo de eritrocitos en solución acuosa a pH fisiológico. El conteo de eritrocitos se realizará en presencia de complejos de Hierro utilizando un microscopio de resolución adecuada. Los complejos que por sí mismos (en ausencia de la toxina) provoquen un daño produciendo la muerte de este no se probará con la toxina, sin embargo el complejo que por sí mismo no dañe al glóbulos rojos o el que presente mejores resultados en términos de muerte celular, será probado en presencia de la toxina esfingomielinasa C.

## II. Marco Teórico

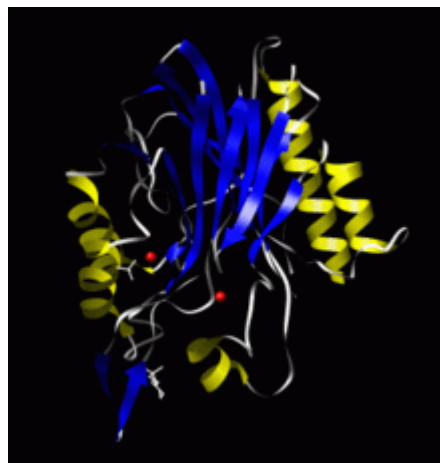
### II.1 Esfingomielinasa

El efecto tóxico del veneno de *Loxosceles* ha sido asociado con una proteína de 35 KD (F35) y presenta actividad de ESFINGOMIELINASA [8,9-12]. La ESFINGOMIELINASA D (ver figura 1) es el principal componente en la acción dermonecrótica del veneno de la *Loxosceles*, la fracción F35 es capaz de provocar desagradables efectos y es altamente letal en ratones [13].

Cuando el veneno de la araña de rincón es inoculado viaja rápidamente por la vía linfática y por la sangre causando: efectos hemolíticos como resultado de la toxina sobre la membrana de los hematíes, la destrucción de los eritrocitos libera fibrinógeno y produce agregación plaquetaria extendiendo la coagulación intravascular que a su vez provoca una anemia progresiva que agravada puede producir un estado de shock o coma. Todo esto contribuye al daño local por obstrucción vascular, además de la secreción de serotonina por las plaquetas activadas y la inducción de quimiotaxis hacia el sitio de la mordedura [14]. La difusión de la coagulación intravascular además daña la integridad de las membranas de los glóbulos rojos en el riñón, resultando en hemorragia y en insuficiencia renal [15].

En general; los síntomas que van de dolor local, contracciones musculares, temblor, delirio, cólicos, taquicardia, arritmias y abdomen duro pueden aparecer incluso después de 1 hora.

Figura 1: Estructura de la esfingomielinasa desde [Bacillus cereus](#).



## II.2 Quitosano

El quitosano es un polisacárido natural de gran importancia debido a su aplicación en procesos industriales y en sistemas biológicos, debido a que cuenta con distintos grupos funcionales y especialmente a las propiedades fisicoquímicas que presenta en solución. Es un biopolímero catiónico obtenido por la N-desacetilación de quitina, constituido por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidas a través de un enlace glicosídico  $\beta$ -1,4. (Figura 2). Su actividad biológica se basa en la presencia de grupos aminos libres en posición del carbono 2 de las unidades D-glucosamina y está distribuido en algunos animales constituyendo cerca de un 80% de su exoesqueleto y en hongos en 30% a un 60% de la pared celular [16].

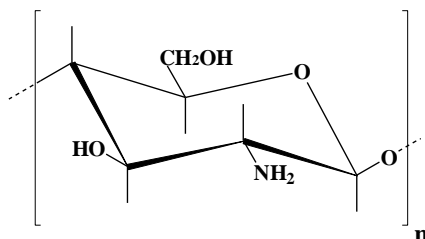


Figura 2: Estructura molecular del quitosano.

## II.3 Organización de la membrana de Eritrocito

Los eritrocitos son las células más abundantes en la sangre, es un disco bicóncavo de más o menos 7 a 7,5 micrómetros de diámetro y de 80 a 100 fL de volumen. La membrana de eritrocitos es compleja y muy importante ya que debe soportar la forma celular y la permeabilidad selectiva. Cuando una célula se hace vieja, la membrana de se vuelve rígida, permeable y el eritrocitos son destruidos en el vaso. La vida media de un eritrocito normal es de 100 a 120 días, tiempo en el cual

transportan oxígeno por medio de la hemoglobina, un complejo molecular que contiene el grupo hemo el cual tiene el Hierro en el medio enlazándose temporalmente al oxígeno molecular liberándolo en diferentes partes del cuerpo. La hemoglobina también transporta productos residuales, como el dióxido y monóxido de carbono; la hemoglobina es el pigmento que da a la sangre su típico color rojo. Algunos procesos que producen la prematura descomposición de los glóbulos rojos reduciendo el transporte de oxígeno pueden causar hemólisis: reacciones e inmunitarias, toxinas y venenos, como algunos tratamientos como la hemodiálisis o el uso de la máquina de derivación corazón-pulmón. [17, 18]

El modelo ilustrado en la figura 3 muestra las proteínas asociadas al citoesqueleto de la membrana que forma al eritrocito, existe consenso en relación al componente de mayor masa molecular (espectrina) unida a la banda 3 y cuál es la relación del cambio de esta y la presencia de anticuerpos naturales con el envejecimiento celular. Estos anticuerpos se ha demostrado que actúan en la eliminación de eritrocitos en infecciones virales en diversas anemias hemolíticas, en eritrocitos infectados con malaria y en epilepsias idiopáticas [19-23].

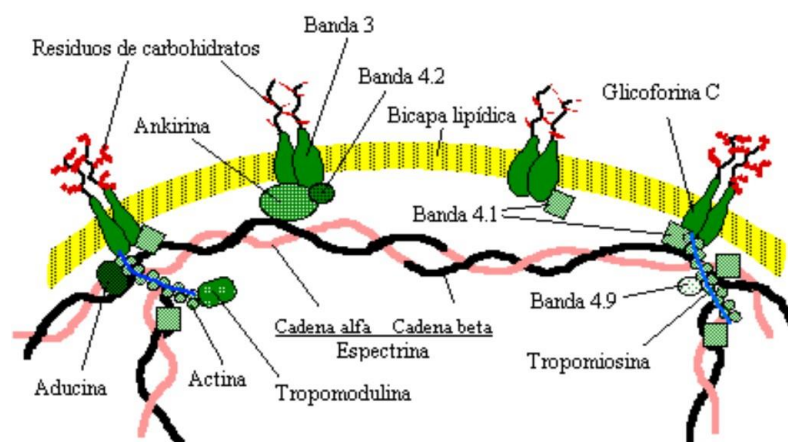


Figura 3: Organización de la membrana eritrocitaria, proteínas de la membrana asociadas con el cito-esqueleto. [24]



## **II.4 Mecanismo de Acción y Tratamiento**

El mecanismo de unión entre la enzima y la proteína de la membrana celular de los eritrocitos no es conocida. Por otro lado, el intercambio aniónico ocurre en la banda tres (AE1) que es la proteína integral principal de la membrana del eritrocitos; y tienen un peso molecular aproximado de 95 KD, constituido por 911 aminoácidos. Esta proteína multifuncional tiene tres responsabilidades: como membrana transversal donde sucede el intercambio cloruro/bicarbonato, tiene una terminal citoplasmática corta y una terminal citoplasmática larga [25, 26].

Una función fundamental de terminal largo de la banda tres es el anclaje de la membrana de eritrocitos al citoesqueleto.

Luego, la banda tres constituye el elemento central de un macro complejo y proteínas periféricas de la membrana del eritrocitos. Alteraciones en la banda tres han sido observadas en enfermedades como el Alzheimer, disquinesia idiopática, epilepsia en idiopática, enfermedades cardiovasculares, probablemente esté involucrada como sitio de ataque de la toxina.

Muchos tratamientos para el veneno de la araña han sido propuestos incluyendo el uso de analgésicos, tratamiento de oxígeno hiperbárico, cirugía, corticosteroides o terapias de mantención [27-32].

El antídoto hecho en Brasil, ha sido recomendado para pacientes con loxoscelismo y envenenamiento sistemático como local, sin embargo los resultados no son los mejores: y de las limitaciones pueden atribuirse al tiempo transcurrido entre la mordedura de la aplicación del antídoto el cual puede pasar entre 24 y 36 h. Lo ideal es usar el antídoto durante las primeras 4 horas después de la mordedura, debido a la rápida acción del veneno [28].

El antiveneno producido en Estados Unidos presenta mayor seguridad con respecto a los sueros de inmunoglobulina, porque disminuye la probabilidad de reacciones adversas [32].

Estudios experimentales recientes realizados con conejos, han demostrado que la eficiencia de la inyección del anti-veneno *in situ* disminuye la herida dermonecrotica, si el tiempo entre la inyección del veneno y el antídoto es menor a 6 horas [32-34].

El mecanismo por el cual la esfingomielinasa D destruye la membrana plasmática de los glóbulos rojos es desconocido. Sería un gran avance si tuviésemos una idea acerca de cómo esta toxina destruye los eritrocitos.

### **III. Metodología**

#### **III.1 Preparación de la muestra**

La extracción de sangre fue mediante punción cutánea, en la 3 falange del dedo con una lanceta (vialcare 286,USA) de 3mm aproximadamente, previa limpieza con etanol Winkler al 75%, posteriormente con guantes de nitrilo Glomed se realiza la siguiente dilución para obtener la solución final de sangre:

Se recolectan 20  $\mu$ L de sangre con una micropipeta (Brand Alemania) de 20  $\mu$ L y se agregan 50  $\mu$ L de NaCl para análisis (Winkler) al 0,9%, en un tubo eppendorf (libres de nucleasas y estériles) de 1,5 mL. Luego se toman 5  $\mu$ L de esta solución con una micropipeta de 10  $\mu$ L y se diluye hasta 210  $\mu$ L agregando 200  $\mu$ L de NaCl al 0,9%, en un tubo eppendorf de 1,5 mL.

Los siguientes pasos son utilizados para preparar la dilución para los distintos complejos utilizados durante el experimento:

1  $\mu$ L de complejo con ayuda de una micropipeta de 10  $\mu$ L se diluyen con 1000  $\mu$ L de NaCl al 0,9%, 200  $\mu$ L de esta solución son diluidos nuevamente con 800  $\mu$ L de NaCl al 0,9%.

Luego se dispuso para cada medición 7 tubos eppendorf de 0,2 mL para los distintos complejos, donde el tubo N°1 corresponde a tiempo cero, el tubo N°2 corresponde al tiempo 3 y así hasta el tubo 7 con 5, 15, 30, 120 y 180 minutos, donde en cada uno se colocaban:

1. 10  $\mu$ L de la dilución final de sangre.
2. 90  $\mu$ L de NaCl al 0,9%.
3. 10  $\mu$ L de la dilución final de cada complejo sintetizados en el laboratorio de Recursos Naturales.
4. 10  $\mu$ L de azul tripan (para tinción).

En cada tubo se agregaban las diluciones 1 y 2, para luego agregar la dilución 3, desde el tubo 7 con 180 minutos hasta llegar al tubo 1. La idea es que la reacción nos permita medir en el determinado tiempo, y al momento de realizar la medición se agrega la solución 4 para cuantificar.

Luego con una micropipeta de 10  $\mu\text{L}$  se recolecta 10  $\mu\text{L}$  de cada tubo con los componentes antes nombrados, y se colocan en una cámara Neubauer (termoscientific, USA), la que posteriormente se monta en el microscopio Olympus CX31. Para cada complejo se realizó el mismo procedimiento.

### III.2 Cuantificación

La cámara Neubauer se utiliza para el recuento de células en un medio líquido que está adaptada al microscopio. Consta de 2 zonas en cuyo fondo se ha marcado una cuadrícula de conocidas dimensiones. Esta se cubre con un cubreobjetos y entre estos se coloca el líquido con las células a contar. La cámara tiene un cuadrado con 9 cuadrados secundarios, cada uno de ellos dividido en 16 cuadrados terciarios.

Se elige uno de los 16 cuadrados terciarios para cuantificar los eritrocitos, la cantidad de eritrocitos se multiplica por 16, realizándose el mismo procedimiento para otros 2 cuadrantes y así obtener un dato promedio, para todos los tiempos.

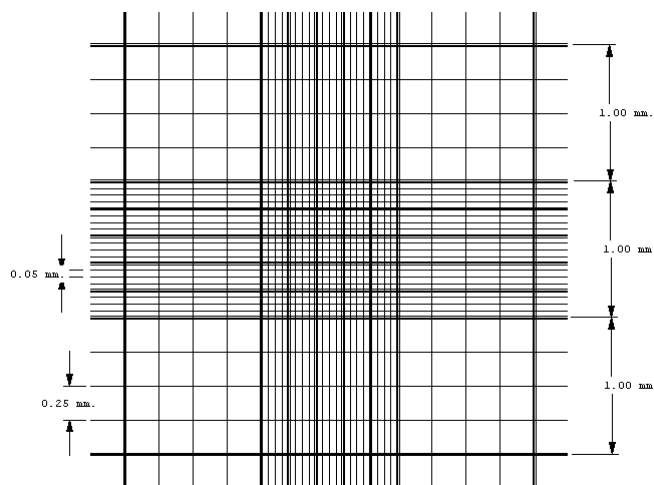


Figura 5: cámara Neubauer utilizada para cuantificar células (eritrocitos).

## IV. Resultados y Discusión

### IV.1 Eritrocitos en presencia de complejos de quitosano

En la tabla N° 1 se observan los resultados obtenidos para el complejo de quitosano, cuando R = -F en presencia de eritrocitos. Se puede observar que hay una baja muerte celular hasta el minuto 5, en el minuto 15 se observa una mayor muerte celular que disminuye luego en el minuto 30, curiosamente en el minuto 120 y 180 aumenta nuevamente, considerando que a mayores tiempos la probabilidad de muerte celular aumenta debido a otros factores.

<b>complejo QUIT-F Fe [2,2838 x 10<sup>-8</sup>]</b>		
<b>Tiempo(min)</b>	<b>N° Eritrocitos</b>	<b>muertas/total de células</b>
1'	48	0
3'	42,7	0.11
5'	42,7	0.11
15'	21,3	0.56
30'	42,7	0.11
120'	37	0.23
180'	21	0.56

Tabla 1: tiempo v/s relación entre células muertas y el total de células para el complejo quitosano cuando R = -F de concentración [2,2838 x 10<sup>-8</sup>].

En la tabla N° 2 se puede apreciar los resultados obtenidos para el complejo de quitosano cuando R= Cl en presencia de eritrocitos. Se puede observar que en el minuto 5 hay una mayor cantidad de células muertas, en el minuto 15 y 30 disminuye la muerte celular, mientras que en el minuto 120 vuelve a aumentar la hemólisis que luego disminuye levemente en el minuto 180.

En el minuto 3 se aprecia un valor negativo atribuible principalmente a errores experimentales.

<b>complejo QUIT-Cl Fe [8,0808 x 10<sup>-6</sup>]</b>		
<b>Tiempo(min)</b>	<b>N° eritrocitos</b>	<b>Muertas/total células</b>
1'	32	0
3'	58	negativo 0.81
5'	16	0.5
15'	26	0.19
30'	26	0.19
120'	16	0.5
180'	21	0.34

Tabla 2: tiempo v/s relación entre células muertas y el total de células para el complejo quitosano cuando R = -Cl de concentración [8,0808 x 10<sup>-6</sup>].

En la tabla N° 3 se observan los resultados obtenidos para el complejo de quitosano cuando su radical metoxi (R= -OCH<sub>3</sub>) en presencia de eritrocitos. Se pueden observar que en el minuto 3 hay una baja muerte celular respecto al minuto 1, mientras que en el minuto 15 y 180 se observa un notable aumento de muerte celular.

<b>complejo QUIT - OCH<sub>3</sub> Fe [3,1148x10<sup>-5</sup>]</b>		
<b>Tiempo(min)</b>	<b>N° eritrocitos</b>	<b>Muertas/total células</b>
1'	16	16
3'	12	12
5'	20	20
15'	5	5
30'	-	-
120'	-	-
180'	5	5

Tabla 3: tiempo v/s relación entre células muertas y el total de células para el complejo quitosano con radical metoxi (R= -OCH<sub>3</sub>) de concentración [3,1148x10<sup>-5</sup>].

En la tabla N°4 se pueden observar los resultados obtenidos para el complejo quitosano con el radical hidrogeno en presencia de eritrocitos. Se puede apreciar que en el minutos 3 hay una baja muerte celular, mientras que desde el minuto 5 al 30 aumenta para permanecer relativamente constante hasta el minuto 180.

<b>complejo QUIT-H</b>		
<b>Tiempo(min)</b>	<b>N° eritrocitos</b>	<b>Muertas/total células</b>
1'	1931	0
3'	837	0,57
5'	592	0,69
15'	277	0,87
30'	187	0,9
120'	11	0,99
180'	5	0,99

Tabla 4: tiempo v/s relación entre células muertas y el total de células para el complejo quitosano con radical hidrogeno.

En la tabla N°5 se pueden ver los resultados para el comportamiento del complejo frente a la presencia de eritrocitos. La acción citotóxica del complejo incrementa en el tiempo acoplándose a esta acción otros factores como la temperatura, cambios de pH, etc.

<b>R=-CH<sub>3</sub></b>		
<b>Tiempo(min)</b>	<b>N° eritrocitos</b>	<b>Muertas/total células</b>
1'	293	0
3'	288	0,02
5'	197	0,33
15'	169	0,42
30'	77	0,74
120'	59	0,78
180'	58	0,80

Tabla 5: tiempo v/s relación entre células muertas y el total de células para el complejo de hierro cuando el sustituyente es el grupo metil.

## IV.2 Eritrocitos en presencia de complejos de quitosano y la enzima

En la figura 5 se puede observar el porcentaje de células vivas en función del tratamiento tanto con la enzima esfingomielinasa C, como con el complejo de quitosano que presento ser menos nocivo frente al glóbulo rojo.

El control se trata de eritrocitos en solución de cloruro de sodio al 0,9%, mientras que el tratamiento de eritrocitos con la enzima muestra una notable disminución de las células vivas entre un 50% y un 60% en un tiempo de 15 minutos. El ensayo entre los eritrocitos en presencia de los complejos de quitosano, indican que la mayoría de estos complejos provocan igual o mayor muerte celular que la enzima, exceptuando el complejo de quitosano sustituido con el grupo metil (-CH<sub>3</sub>) que presenta aproximadamente un 5% de muerte celular. Al realizar el estudio con eritrocitos este complejo y la enzima se observa que el complejo protege a los eritrocitos mostrando una muerte celular menor a un 80%.

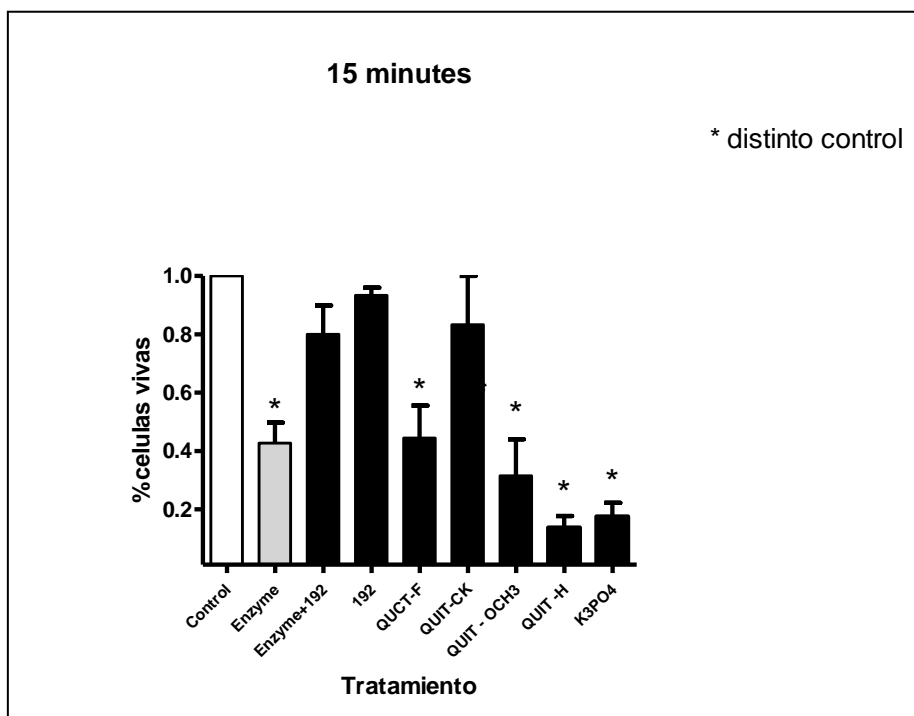


Figura 5: razón entre células vivas y células totales v/s el tratamiento con los diferentes complejos de quitosano y la enzima esfingomielinasa C.

## **V. Conclusión**

El complejo de quitosano de hierro sustituido con el grupo metil provoca menor muerte celular de eritrocitos en solución acuosa. Cuando este complejo está en presencia de la toxina esfingomielinasa C, protege al eritrocito ya que interactúa con la toxina oxidando una parte de ella. El cambio estructural o funcional de una parte de la toxina hace que su cinética sea más lenta.

El mecanismo por el cual ocurre la interacción entre el complejo y la toxina aun no es conocido, y la explicación de que solo el complejo de hierro con el sustituyente metil presenta actividad con la esfingomielinasa C, se puede atribuir a la acción del grupo metil como parte importante en el encaje con la toxina o como grupo que permite que el complejo de quitosano englobe la toxina.



## VI. Bibliografía

- [1] Veiga SS, Gremski W, Dos Santos VL, et al., *Toxicon*, **37** (1999) 587-607.
- [2] Losa C., Calio P., Castro E., Jato-Vila J.L., Alonso M.J, *J. Pharm. Pharmacol*, **43** (1991) 548.
- [3] Calvo P., Sánchez A., Martínez J., MLópez.I., Calonge M., Pastor J.C, Alonso M.J, *Pharm. Res.*, **13** (1996) 311.
- [4] Jiang L., Wang R., Li X., Jiang L., Lu G., *Electrochem. Comm.*, **7** (2005) 597.
- [5] Xu Q., Mao Ch.,Liu N.N., Zhu J.J., Sheng J., *Biosensors and Bioelectronics*, **22** (2006) 768-773.
- [6] Feng J., Zhao G., Xu J-J., Chen H.Y, *Analytical Biochemistry*, **342** (2005) 280.
- [7] Huang H., Hu N., Zeng Y., Zhou G., *Analytical Biochemistry*, **308** (2002) 141.
- [8] Kurpewski G, Forrester LJ, Barret JT, Campbell BJ. *Biochim Biophys Acta*, **18 678(3)** (1981) 467-76.
- [9] Gendron BP. *Am. J Emerg Med.*, **8(1)** (1990;) 51-4.
- [10] Gebel HM, Finke JH, Elgert KD, Campbell BJ, Barret JT. *Am J Trop Mes Hyg* **28(4)** (1979) 756-62.
- [11] Majeski JA, Durst GGSr. *Med J.*, **69(7)** (1976) 887-9.
- [12]García A, Ceballos G. Guía de campo de los reptiles y anfibios de la costa de Jalisco, México. México. Fundación Ecológica Cuixmala, A C-Instituto de Biología UNAM, 1994.
- [13] Kelton JG et al. *Prog Clin Biol Rev.* 1990; 337:141.
- [14] Otero R. Envenenamiento por mordeduras de arañas y ciempiés. Otero, R, Ángel R, García M. Primer Simposio Colombiano de Toxicología. Ecográficas Limitada., Medellin, 1998; 179-88.
- [15] Veiga SS, Feitosa L, Dos Santos VL, et al.,. *Histochem J.*, **32** (2000) 397-408.
- [16] R.C. Berkeley. Chitin, chitosan and their degradative enzymes. En "Microbial polysaccharides and polysaccharases", R.C. Berkeley, G. W. Gooday y D.C. Ellwood, ed., Academia Press, Londres, pp. 205-236 (1979).

- [17] Hoffman R, Benz Jr. EJ, Shattil SJ, et al. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone; 2005.
- [18] Goldman L, Ausiello D. *Cecil Textbook of Medicine*. 22nd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 2004.
- [19] Green GA. *Blood*, **82** (1993) 985-92.
- [20] Crandall I, Guthrie N, Sherman IW. *Am J Trop Med Hyg.*, **52** (1995) 450-5.
- [21] Crandall I, Guthrie N, Sherman IW. *Exp Parasitol*, **82** (1996) 45-53.
- [22] Janvier D, Sellami F, Missud F, Fenneteau O, Vilmer E, Cartron J, et al. *Transfusión*, **42** (2002) 1547-52.
- [23] Bosman G. *Cell Mol Biol.*, **50** (2004) 81-6.
- [24] (<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/rbcmembrane.html>)
- [25] Tanner MJA. [review]. *Mol Membr Biol.*, **14** (1997) 155-65.
- [26] Zhang D, Kiyatkin A, Bolin JT, Low PS. Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood*, **96** (2000) 2925-33.
- [27] Rees R, Rieger E, King LE.. *Ann Emer Med.*, **16** (1987) 403-15.
- [28] Furtrell JM. *Am J Med Sci.*, **304** (1992) 267.
- [29] King LE, Rees RS. *JAMA.*, **250** (1983) 648.
- [30] Strain GM, Snider GM, Tedford BL, Cohn GH. *Toxicon*, **29** (1991) 989-96.
- [31] Braz A, Minozzo J, Abreu JC, et al. *Toxicon*, **37** (1999) 1323-8.
- [32] Gómez HF, Miller MJ, Trachy JW, et al. *Acad Emerg Med*, **6** (1999) 1195-202.
- [33] Gómez HF, Miller MJ, Waggener MW, et al. *Toxicon*, **39** (2001) 817-24.
- [34] Guilherme P, Fernandes I, KC. B. *Toxicon*, **39** (2001) 1333-42.