



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA**

ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Connarus favosus* Planch.
E SEU PAPEL BLOQUEADOR DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE
Bothrops atrox, DE ACORDO COM O USO TRADICIONAL

THAÍS PEREIRA DA SILVA

MANAUS - AM
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA**

ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Connarus favosus* Planch.
E SEU PAPEL BLOQUEADOR DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE
Bothrops atrox, DE ACORDO COM O USO TRADICIONAL

THAÍS PEREIRA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologia para a Saúde.

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristina dos Santos
Coorientadora: Professora Doutora Rosa Helena Veras Mourão

MANAUS - AM
2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586a Silva, Thaís Pereira da
Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Connarus favosus* Planch. e seu papel bloqueador da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox*, de acordo com o uso tradicional / Thaís Pereira da Silva. 2015
89 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Cristina dos Santos
Coorientadora: Rosa Helena Veras Mourão
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Connarus favosus* (Verônica). 2. *Bothrops atrox* (Jararaca-do-norte). 3. Plantas anti-ofídicas. 4. Acidentes ofídicos. 5. Medicina popular. I. Santos, Maria Cristina dos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia



92ª. ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No dia 19 de novembro de 2015 às 09h, Na sala de aula do Bloco “G - UFAM. **Thais Pereira da Silva** defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulada: “**Atividades antioxidante e antimicrobiana de Connarus favosus Planch e seu papel bloqueador da atividade hemorrágica do veneno de Bothrops atrox, de acordo com o uso tradicional**”.

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dra. Maria Cristina dos Santos – (Presidente)	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dr. Wuelton Marcelo Monteiro - (FMT/AM)	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dr. Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes – (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ()	

Manaus, 19 de novembro de 2015.

Resultado Final: Aprovado (a) (X)
Reprovado (a) ()

Coordenador do PPGBIOTEC– UFAM.

Dedico esta dissertação aos meus pais, por sempre me incentivarem a desenvolver senso crítico e percepção através de experiências próprias e também por sempre me apoiarem em minhas escolhas, tanto pessoais, quanto profissionais.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Maria Cristina dos Santos, pelos conhecimentos transmitidos, e principalmente, pela paciência e amizade;

À minha coorientadora Dra. Rosa Helena Veras Mourão pelas sugestões, pelos conhecimentos e pela hospitalidade;

Às minhas amigas Valéria Moura e Juliana Lameiras pelo companheirismo e ajuda nos momentos em que precisei, tanto no âmbito pessoal, quanto em experimentos e elaboração dos artigos;

À Juliana Raposo e todos do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará pela ajuda nos experimentos de ensaios colorimétricos e sugestões;

Ao Senhor Reinaldo da comunidade São Pedro, por transmitir seus conhecimentos a respeito das plantas medicinais antiofídicas;

À Dra. Cecília Verônica Nunez pelas sugestões e parceria com o Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA);

À Kissinara Silva e Mara Giselle Mendes pelo experimento de atividade antioxidante realizado no INPA;

À Maria Carolina Scheffer Souza e Vanessa Santos pelos experimentos de atividade antimicrobiana e prospecção de constituintes, mas, principalmente pela disposição em horários e dias de semana não convencionais para o desenvolvimento dos experimentos;

À Patrícia Almeida e Emerson Lima pelo experimento de citotoxicidade realizado no Laboratório de Atividade Biológica na Universidade Federal do Amazonas;

A todos do Laboratório de Imunologia pelo companheirismo e suporte;

Ao Antônio Boechat pelas sugestões na banca de qualificação e esclarecimentos sobre noções básicas de análises estatísticas;

Ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia pela extensão dos prazos e aos meus colegas de turma do Mestrado;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Biotério da Universidade Federal do Oeste do Pará e aos animais utilizados nos experimentos, meu respeito;

Aos meus Amigos de Manaus, especialmente ao Beto Montrezol pelo companheirismo, paciência e suporte;

À minha família e amigos de Curitiba que, mesmo à distância, sempre me apoiaram e de deram suporte para concluir o mestrado;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para desenvolvimento desta dissertação.

*“Science is more than a body of knowledge.
It’s a way of thinking, a way of skeptically
interrogating the universe.”
(Carl Sagan)*

*“Ignorance more frequently begets confidence than does knowledge:
It is those who know little, and not those who know much, who so positively
assert that this or that problem will never be solved by science.”
(Charles Darwin)*

*“Science is simply common sense at its best,
that is, rigidly accurate in observation,
and merciless to fallacy in logic.”
(Thomas Huxley)*

RESUMO

Os envenenamentos decorrentes de picadas de serpentes foram classificados, em 2009, pela Organização Mundial da Saúde, como doença tropical negligenciada. No Brasil, o gênero *Bothrops* sp. é responsável pela maioria destes acidentes e, na região Amazônica, grande parte dos relatos de ofidismo é atribuída à espécie *Bothrops atrox*. Os venenos das espécies do gênero *Bothrops* sp. são compostos predominantemente por proteínas como fosfolipases A_2 , metaloproteinases, serinaproteases, entre outros. A atividade hemorrágica é causada pela ação de metaloproteinases que induzem dano vascular e zonas isquêmicas que contribuem para o surgimento de necrose do tecido local. O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil para esses acidentes é a administração de antiveneno, entretanto, este imunobiológico não neutraliza os efeitos locais de forma eficaz. As comunidades ribeirinhas, da região Norte do Brasil, tem dificuldade de acesso ao tratamento soroterápico e utilizam plantas da medicina popular para bloquear as ações induzidas pelos venenos de serpentes. O presente estudo investigou o potencial do extrato aquoso de *Conarus favosus* (EACf) em inibir as atividades hemorrágica e fosfolipásica A_2 induzida pela peçonha da serpente *Bothrops atrox* (PBa) determinar os potenciais antioxidantes e antimicrobianos do extrato. EACf foi analisado fitoquimicamente para metabólitos secundários e os compostos fenólicos (taninos condensados e taninos hidrolisáveis) foram determinadas por ensaios colorimétricos. A ação antioxidante foi avaliada por ensaios quantitativos de 2,2-difenil-1-picril- hidrazila (DPPH) e Fe^{3+} /Fenantrolina. A ação antimicrobiana foi avaliada por difusão em disco e concentração mínima inibitória, e a citotoxicidade foi avaliada utilizando linhagem de fibroblasto humano (MRC-5). A inibição da atividade hemorrágica induzida pelo PBa foi avaliada por administração via oral do EACf, seguindo protocolos de pré-tratamento, pós-tratamento e ação coadjuvante (EACf + soro antibotrópico SAB). A inibição da hemólise indireta causada pela fosfolipase A_2 (PLA₂) foi testada in vitro. A interação entre EACf e PBa foram avaliadas por eletroforese SDS-PAGE, Western Blot (Wb) e Zimografia. No perfil fitoquímico foram identificadas dez classes de metabólitos secundários, e os ensaios colorimétricos mostraram altas quantidades de fenóis totais e taninos (condensados e hidrolisáveis). O EACf exibiu alto potencial antioxidante e antimicrobiano. O IC₅₀ do efeito citotóxico foi 51,91 (46,86 - 57,50) µg/mL. A inibição da atividade hemorrágica do PBa foi significativa em todos os protocolos testados, e a inibição da PLA₂ foi significativa para as duas concentrações mais altas. A mistura PBa/EACf produziu as mesmas bandas do veneno isolado no SDS-PAGE e Wb, porém de forma mais branda. A zimografia confirmou a atividade proteolítica do PBa, mas quando o veneno foi pré-incubado com o EACf houve bloqueio dessa atividade. O EACf foi eficaz no bloqueio da atividade hemorrágica da PBa quando administrado nas doses e via tradicionalmente utilizadas.

Palavras-chave: *Conarus favosus*, *Bothrops atrox*, plantas antiotóxicas, acidentes ofídicos, medicina popular.

ABSTRACT

Envenomings resulting from snakebites were classified, in 2009, by the World Health Organization as a neglected tropical disease. In Brazil, the genus *Bothrops* sp. is responsible for most of these accidents and, in the Amazon region, the majority of snakebite reports is attributed to the species *Bothrops atrox*. The venom from snakes of the genus *Bothrops* sp. is composed by proteins such as phospholipase A₂, metalloproteinases, among others. The hemorrhagic activity is caused by metalloproteinase which induce vascular damage and ischemic zones which contribute to the appearance of necrosis in the local tissue. The treatment recommended by the Ministry of Health of Brazil against snakebites is the antivenom administration, however, this treatment does not neutralize the local effects satisfactorily. The coastal communities of Northern Brazil, due to long distances from health centers, have limited access to serumtherapy treatment and use plants of folk medicine to block the actions induced by snake venoms. This study investigated the potential of the aqueous extract of *Connarus favosus* (AECf) to inhibit hemorrhagic and phospholipase A₂ activities induced by *Bothrops atrox* venom (BaV) and to determine the antioxidant and antimicrobial potentials of the extract. AECf was analyzed phytochemically for secondary metabolites and phenolics (condensed tannins and hydrolyzable tannins) by colorimetry. Antioxidant activity was evaluated by quantitative assays using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Fe³⁺/phenanthroline. Antimicrobial activity was evaluated by the disk diffusion and minimal inhibitory concentration test, and cytotoxicity was evaluated using human fibroblast cells (MRC-5). Inhibition of BaV-induced hemorrhagic activity was assessed after oral administration of the extract using pre-treatment, post-treatment and combined (BA plus AECf) treatment protocols. Inhibition of indirect hemolysis caused by phospholipase A₂ (PLA₂) was investigated *in vitro*. Interaction between AECf and BaV was investigated by SDS-PAGE electrophoresis, Western blot (Wb) and zymography. The phytochemical profile of AECf revealed ten secondary metabolite classes, and colorimetry showed high total phenolic and total (condensed and hydrolyzable) tannin content. AECf exhibited high antioxidant and antimicrobial potentials. The IC₅₀ for the cytotoxic effect was 51.91 (46.86 - 57.50) µg/mL. Inhibition of BaV-induced hemorrhagic activity was significant in all the protocols, and inhibition of PLA₂ activity was significant with the two highest concentrations. The BaV/AECf mixture produced the same bands as BaV by itself in SDS-PAGE and Wb although the bands were much fainter. Zymography confirmed the proteolytic activity of BaV, but when the venom was pre-incubated with AECf this activity was blocked. AECf was effective in reducing BaV-induced hemorrhagic activity when administered by the same route as that used in folk medicine.

Keywords: *Connarus favosus*, *Bothrops atrox*, anti-snakebite plants, snakebites, folk medicine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1. Aspectos das lesões locais ocasionadas por envenenamento botrópico. 6
- Figura 2. Aspecto geral de *Connarus favosus* Planch. 15

CAPÍTULO II

- Figura 1. Valores de concentração mínima inibitória determinados por ensaio colorimétrico pelo extrato aquoso de *Connarus favosus* (1-5 mg/mL) em *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Nocardia brasiliensis* e *Staphylococcus aureus*. 38
- Figura 2. Efeito citotóxico causado pelo extrato aquoso de *Connarus favosus*, em diferentes concentrações, em células de fibroblasto humano MRC-5. 39
- Figura 3. Inibição da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* (PBa) pelo extrato aquoso de *Connarus favosus* utilizando diferentes tratamentos. 40
- Figura 4. Peles de animais após teste de inibição dos halos hemorrágicos induzidos pela peçonha de *Bothrops atrox* (PBa), em diferentes tratamentos com extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) e soro antibotrópico (SAB). 41
- Figura 5. Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops atrox* (PBa) por diferentes doses do Extrato aquoso de *Connarus favosus* ou soro antibotrópico, incorporado ao gel. 42
- Figura 6. Interação entre o Extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) e peçonha de *Bothrops atrox* (PBa 15µL): (A) eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE-15%) e (B) Western blot (15%). 43
- Figura 7. Zimografia mostrando a atividade proteolítica do veneno de *Bothrops atrox* (PBa 15µL), Extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) e a interação entre ambos (PBa + EACf 1:5). 44

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Lista de espécies vegetais com ação anti-hemorrágica contra peçonha de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> sp.	9
Tabela 2. Lista de espécies vegetais testadas frente à atividade hemorrágica do veneno de serpentes <i>Bothrops atrox</i> seguindo protocolo de pré-incubação.	13

CAPÍTULO II

Tabela 1. Teste fitoquímico qualitativo para detecção de metabólitos secundários no extrato aquoso de <i>Connarus favosus</i> (EACf).	36
Tabela 2. Fenois totais, taninos totais, taninos hidrolisáveis e taninos condensados contidos no extrato aquoso de <i>Connarus favosus</i> (EACf).	36
Tabela 3. Atividade antioxidante testada com o extrato aquoso de <i>Connarus favosus</i> (EACf 5 mg/mL), determinado pelos testes com DPPH e Fe ³⁺ .	37
Tabela 4. Teste de difusão em disco do extrato aquoso de <i>Connarus favosus</i> (EACf 5 mg/mL) em <i>Bacillus cereus</i> (BC), <i>Corynebacterium glutamicum</i> (CG), <i>Escherichia coli</i> (EC), <i>Edwardsiella tarda</i> (ET), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP), <i>Nocardia brasiliensis</i> (NB), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PF), <i>Salmonella enteridis</i> (SE), <i>Staphylococcus aureus</i> (SA) e <i>Serratia marcescens</i> (SM).	37
Tabela 5. Inibição do crescimento bacteriano por diferentes concentrações do EACf em <i>Bacillus cereus</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Nocardia brasiliensis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> .	38

CAPÍTULO III

Tabela 1. Teste fitoquímico qualitativo para detecção de metabólitos secundários no chá das cascas e extrato aquoso liofilizado de <i>Connarus favosus</i> (EACf).	62
--	----

Tabela 2. Atividade antioxidante testada com o chá das cascas e extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf), ambos na concentração de 5 mg/mL, determinado pelos testes com DPPH e Fe³⁺. Ácido ascórbico [AA] foi usado como antioxidante equivalente.

63

Tabela 3. Teste de difusão em disco do chá das cascas e extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf), nas concentrações de 5 mg/mL, para avaliar o potencial de inibição do crescimento de *Bacillus cereus* (BC), *Corynebacterium glutamicum* (CG), *Escherichia coli* (EC), *Edwardsiella tarda* (ET), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Nocardia brasiliensis* (NB), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Pseudomonas fluorescens* (PF), *Salmonella enteridis* (SE), *Staphylococcus aureus* (SA) e *Serratia marcescens* (SM).

63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CIM – Concentração inibitória mínima

CLECL - Lectina-like do tipo C

DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DMH - Dose mínima hemorrágica

DMHi - Dose mínima hemolítica indireta

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EACf - Extrato aquoso de *Connarus favosus*

FBS – Soro fetal bovino

i.d.- Intradérmico

LAAO - L-aminoiácido oxidase

PBa - Peçonha de *Bothrops atrox*

PLA₂ - Fosfolipase A₂

SAB - Soro antibotrópico

SDS-PAGE - Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SVMP - Metaloproteinase

SVSP - Serinaprotease

TBS - Salina tamponada com Tris

v.o. - Via oral

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I</i> - Espécies vegetais utilizadas no bloqueio da atividade hemorrágica induzida pelos venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> sp. com ênfase na espécie <i>Connarus favosus</i> Planch. (Connaraceae)	1
Resumo	1
Abstract	1
1. Introdução	2
2. Metodologia	3
3. Revisão bibliográfica	3
3.1. Acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil	3
3.2. Serpentes	5
3.3. Atividades dos venenos de <i>Bothrops</i> sp. e <i>Bothrops atrox</i>	5
3.4. Espécies vegetais com anti-hemorrágica contra veneno de serpentes	8
<i>Bothrops</i> sp.	
3.5. <i>Connarus favosus</i> Planch. (Connaraceae)	14
4. Conclusão	16
Agradecimentos	16
Divulgação	16
Referências	16
 <i>CAPÍTULO II</i> - Atividades antioxidante e antimicrobiana de <i>Connarus favosus</i> Planch. e seu papel em bloquear a atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> , quando administrada pela mesma via do uso tradicional.	 23
Resumo	24
1. Introdução	26
2. Material e métodos	28
2.1. Obtenção da peçonha de <i>Bothrops atrox</i> (PBa) e soro antibotrópico (SAB)	28
2.2. Animais	28

2.3. Material vegetal	29
2.3.1. Coleta e identificação	29
2.3.2. Obtenção do extrato aquoso de <i>Conarus favosus</i> (EACf) e doses, conforme uso tradicional	29
2.3.3. Determinação das classes de constituintes químicos do extrato	29
2.3.4. Ensaio colorimétrico	30
2.4. Ação antioxidante	30
2.5. Ação antimicrobiana	31
2.5.1. Difusão em disco	31
2.5.2. Teste de concentração inibitória mínima (CIM)	31
2.6. Teste de toxicidade celular	32
2.7. Teste de inibição da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	32
2.8. Inibição da atividade fosfolipásica	33
2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western Blot	34
2.10. Zimografia/atividade proteolítica	35
2.11. Análise estatística	35
3. Resultados	36
3.1. Classes de metabólitos secundários	36
3.2. Ensaio colorimétrico	36
3.3. Atividade antioxidante	36
3.4. Atividade antimicrobiana	37
3.4.1. Difusão em disco	37
3.4.2. Concentração inibitória mínima	37
3.5. Toxicidade celular	39
3.6. Inibição da atividade hemorrágica	39
3.7. Inibição da atividade fosfolipásica	41
3.8. Eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western Blot	42
3.9. Zimografia	43
4. Discussão	45
5. Conclusão	50
6. Agradecimentos	51
7. Referências	51

<i>CAPÍTULO III</i> - Comparação entre o chá preparado conforme uso popular e o extrato aquoso liofilizado das cascas de <i>Connarus favosus</i> Planch. em relação à presença de metabólitos secundários, atividade antioxidante e antimicrobiana	57
1. Introdução	57
2. Material e métodos	58
2.1. Material vegetal	58
2.1.1. Coleta e identificação	58
2.1.2. Obtenção do extrato aquoso de <i>Connarus favosus</i> e doses, conforme uso tradicional	58
2.2. Determinação das classes de constituintes químicos	58
2.2.1. Fenóis e taninos	59
2.2.2. Antocianinas, antocianidinas e flavonoides	59
2.2.3. Leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	59
2.2.4. Flavonóis, flavononas, flavanonóis e xantonas	60
2.2.5. Esteroides e triterpenoides	60
2.2.6. Saponinas	60
2.2.7. Alcaloides	60
2.3. Teste de ação antioxidante	61
2.4. Teste de ação antimicrobiana	61
2.5. Análise estatística	62
3. Resultados	62
3.1. Classes de metabólitos secundários	62
3.2. Atividade antioxidante	63
3.3. Atividade antimicrobiana	63
4. Discussão	64
5. Conclusão	65
6. Referências	65

- ANEXO I – Carta de aceite do artigo de revisão da literatura intitulado “Espécies vegetais utilizadas no bloqueio da atividade hemorrágica induzida pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp. com ênfase na espécie *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae)” a ser submetido à revista *Scientia Amazonia*, avaliado pelos membros da banca julgadora. 67
- ANEXO II – E-mail de confirmação da submissão do artigo científico intitulado “Antioxidant and antimicrobial activities of *Connarus favosus* Planch. and its role in blocking the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom when administered by the same route as in folk medicine” à Revista *Journal of Ethnopharmacology* (ISSN: 0378.8741). 68
- ANEXO III – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual do Pará, em 17 de outubro de 2011, sob o parecer 43/11. 69
- ANEXO IV – Protocolo de Autorização de Acesso ao Conhecimento Tradicional Associado para fins de Pesquisa Científica sob Processo nº 01450.008934/2014-68-DPI/IPHAN. 70
- ANEXO V – Teste de atividade fosfolipásica A_2 : halos hemolíticos de inibição por diferentes doses do extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf), incorporado ao gel, frente à peçonha de *Bothrops atrox* (PBa). A) Controle Positivo (PBa); B) Controle Negativo (SAB); C) 20,83 mg/kg de EACf; D) 62,49 mg/kg de EACf; E) 124,98 mg/kg de EACf. 72

CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO A SER
SUBMETIDO À REVISTA *Scientia Amazonia* (ISSN: 2238.1910)
CARTA DE ACEITE (ANEXO I)

Espécies vegetais utilizadas no bloqueio da atividade hemorrágica induzida pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp. com ênfase na espécie *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae)¹

Plant species used to block the hemorrhagic activity induced by the venoms from genus *Bothrops* sp. with emphasis in species *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae)¹

Thaís Pereira da Silva², Valéria Mourão de Moura³, Rosa Helena Veras Mourão⁴,
Maria Cristina dos Santos⁵

Submetido XX/XX/20XX – Aceito XX/XX/20XX – Publicado on-line XX/XX/20XX

Resumo

Os envenenamentos decorrentes de picadas de serpentes foram classificados, em 2009, pela Organização Mundial da Saúde, como doença tropical negligenciada. No Brasil, o gênero *Bothrops* sp. é responsável pela maioria destes acidentes e, na região Amazônica, grande parte dos relatos de ofidismo é atribuída à espécie *Bothrops atrox*. Os venenos das espécies do gênero *Bothrops* sp. são compostos predominantemente por proteínas como fosfolipases A₂, metaloproteínases, serinaproteases, além de outros componentes orgânicos que contribuem para a indução de diversos danos locais e sistêmicos, dentre esses destacam-se as alterações hemorrágicas tanto no sítio da picada quanto em órgãos vitais. A atividade hemorrágica é causada pela ação de metaloproteínases que induzem dano vascular e zonas isquêmicas que contribuem para o surgimento de necrose do tecido local, resultando em lesão permanente e amputação do membro afetado. O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil para esses acidentes é a administração de antiveneno, entretanto, este imunobiológico não neutraliza os efeitos locais de forma eficaz. Além disso, as comunidades ribeirinhas da região Norte do Brasil, devido às longas distâncias dos centros de saúde, têm dificuldade de acesso ao tratamento soroterápico e na tentativa de suprir essa deficiência utilizam plantas da medicina popular para bloquear as ações induzidas pelos venenos de serpentes. Dentre essas espécies vegetais tidas como antiofídicas, *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae) mostrou eficácia quando testada frente à atividade hemorrágica, induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, conforme uso popular tradicional. Esta revisão visa mostrar os mecanismos e os componentes indutores da atividade hemorrágica dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp. bem como, apresentar as plantas com atividades antiofídicas com ênfase na espécie vegetal *Connarus favosus*.

Palavras-Chave: *Bothrops atrox*, hemorragia, medicina popular e plantas antiofídicas.

Abstract

Envenomings resulting from snakebites were classified, in 2009, by the World Health Organization as a neglected tropical disease. In Brazil, the genus *Bothrops* sp. is responsible for most of these accidents and, in the Amazon region, the majority of snakebite reports is attributed to the species *Bothrops atrox*. The venom from snakes of the genus *Bothrops* sp. is composed by proteins such as

phospholipase A₂, metalloproteinases and other organic components that contribute to the development of many local and systemic damage, including hemorrhagic disorders at the bite site and in vital organs. The hemorrhagic activity is caused by metalloproteinase which induce vascular damage and ischemic zones which contribute to the appearance of necrosis in the local tissue, which may result in permanent damage and amputation of the affected limb. The treatment recommended by the Ministry of Health of Brazil against snakebites is the antivenom administration, however, this treatment does not neutralize the local effects satisfactorily. In addition, the coastal communities of Northern Brazil, due to long distances from health centers, have limited access to serumtherapy treatment and in an attempt to overcome this deficiency they use plants of folk medicine to block the actions induced by snake venoms. Among these plants known as antiophidic, *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae) showed efficacy when tested against the hemorrhagic activity induced by *Bothrops atrox*, according to traditional folk use. This review aims to show the mechanisms and inductive components of the hemorrhagic activity if the venom from snakes of genus *Bothrops* sp. and also present plants with antiophidic activities with an emphasis on plant species *Connarus favosus*.

Key-words: *Bothrops atrox*, hemorrhage, folk medicine and antiophidic plants.

¹Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada no Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, Brasil.

²Mestranda do Programa Multi-institucional de Pós- graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, Brasil. E-mail: thaiscwb@yahoo.com.br.

³Doutoranda do Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, Brasil. E-mail: mouraovm@yahoo.com.br.

⁴Professora Associada da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA, Brasil. E-mail.: mouraorhv@yahoo.com.br.

⁵Professora Associada da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil. CEP 69077-000. E-mail: mcdossantos1957@yahoo.com.br

1. Introdução

Os acidentes ofídicos representam um importante problema de saúde pública e afetam principalmente países tropicais (KASTURIRATNE et al., 2008). No Brasil, esses envenenamentos causam elevada morbidade e mortalidade, sobretudo por causa da dificuldade de acesso aos serviços de saúde, que são na maioria das vezes abaixo do ideal (CARDOSO, 2009). Outro fator que deve ser levado em consideração é a escassez do soro antiofídico, que é o único tratamento específico recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil para tratar envenenamentos por serpentes. Esse problema é agravado principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde a distribuição e o acesso à soroterapia são precários ou inexistentes (DOS-SANTOS, 2009; WEN et al., 2015).

Na Amazônia brasileira, 90% dos casos de envenenamento por serpentes são atribuídos ao gênero *Bothrops* sp. e a espécie *B. atrox* é considerada a principal causadora desses acidentes, porém, *Bothrops atrox* e *Lachesis muta muta* compartilham o mesmo nome popular “*surucucu*” em certas áreas da Amazônia brasileira, trazendo um fator de confusão na identificação da espécie pela população local (BERNARDE; GOMES, 2012), além da coexistência de outras espécies de serpentes peçonhentas. O envenenamento por *Bothrops atrox* causa uma série de complicações resultantes da ação de diferentes toxinas presentes no veneno como metaloproteinases (SVMPs), fosfolipases A₂ (PLA₂s), serinoproteases (SVSPs), ou do sinergismo entre elas (CALVETE et al., 2011; BUSTILLO et al., 2015). Os principais efeitos sistêmicos causados por essas toxinas são hemorragia, coagulopatia e choque cardiovascular. Essas toxinas também podem causar dano tecidual local, caracterizado por edema, formação de bolhas, hemorragia e necrose do músculo esquelético (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009). As complicações locais são decorrentes da necrose e da infecção secundária causada por bactérias da cavidade oral da serpente, da pele ou do ambiente, que podem levar à amputação e/ou déficit funcional do membro (JORGE et al., 1990; PARDAL et al., 2004).

A atividade hemorrágica é um dos sintomas mais graves no quadro de envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* sp. e é ocasionada pela ação de metaloproteínas. Estas toxinas hemorrágicas desempenham um papel importante no dano vascular e subsequente geração de zonas isquêmicas que contribuem em grande parte para o surgimento de necrose do tecido local, resultando em amputação do membro afetado (GUTIÉRREZ et al., 1988; WARRELL, 1992). Uma das toxinas responsáveis pela ação hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca*, a jararagina (metaloprotease hemorrágica da classe PIII) foi isolada, em 1992, e é bastante estudada por pesquisadores do Brasil e de outros países. O mecanismo de ação pelo qual a jararagina induz a hemorragia, foi desvendado em 2010 por pesquisadores do Instituto Butantan. A jararagina se fixa às proximidades dos vasos, ligando-se aos componentes da matriz extracelular, comprometendo sua integridade e induzindo sangramento local (BALDO et al., 2010). Entretanto, depois de estabelecida a lesão local, esta não é revertida pelo soro antiofídico. Sendo assim, ao descobrir como a toxina age e induz a hemorragia é possível investigar tratamentos complementares para as vítimas de envenenamento por serpentes. Muitas espécies vegetais da flora brasileira são indicadas ou utilizadas para o tratamento desses pacientes, assim, esses inibidores naturais podem ser importantes como aliado à soroterapia contra a hemorragia local, causada pelo veneno de serpentes *Bothrops* sp. (BALDO et al., 2010).

Em estudo realizado por CASTRO e colaboradores (1999), foram avaliadas 48 espécies vegetais da Costa Rica quanto ao potencial anti-hemorrágico frente ao veneno de *Bothrops asper*. e, das 48 espécies avaliadas, 10 inibiram totalmente a atividade hemorrágica pelo protocolo de pré-incubação. No Brasil, muitas plantas são utilizadas tradicionalmente em casos de envenenamento por serpentes, sobretudo, na região Norte do País, onde é difícil o acesso ao tratamento convencional. Em um levantamento etnobotânico realizado em comunidades de Santarém, Região Oeste do Pará, foram citadas 24 espécies de plantas de uso antiofídico e 12 destas espécies foram capazes de reduzir, em diferentes porcentagens, a atividade hemorrágica induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*, seguindo protocolo de pré-incubação (MOURA et al., 2015).

Connarus favosus Planch. (Connaraceae), é conhecida popularmente como “Verônica”. Essa espécie endêmica possui distribuição geográfica em três regiões do país, incluindo a Região Norte, onde está representada nos Estados do Amazonas e Pará (FORERO, 1983). A casca de *C. favosus* é comumente utilizada pela população tradicional para tratamento de acidentes ofídicos (MOURA et al., 2013; MOURA et al., 2015). O extrato aquoso da casca foi eficaz no bloqueio das atividades hemorrágica, coagulante, fosfolipásica e edematogênica induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox* (MOURA et al., 2013) e hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca*, testadas pelo protocolo de pré-incubação (MOURA et al., 2015). E quando avaliado de acordo com o uso tradicional, o extrato aquoso inibiu até 66,3% da hemorragia, seguindo protocolo de pós-tratamento utilizando a via oral de administração (Silva et al., 2015 – submetido JEP-D-15-03311). Sendo assim, esta revisão teve por objetivo descrever os aspectos gerais da atividade hemorrágica induzidas pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp., bem como, elencar as espécies vegetais com ação anti-hemorrágica.

2. Metodologia

O conteúdo desta pesquisa bibliográfica foi extraído dos seguintes sites de busca: *ScienceDirect*, *PubMed*, *Web of Science*, *SciELO*, *Scopus*, *Scirus*, dentre outros sítios da internet de fontes oficiais, no período entre março de 2013 e outubro de 2015. Os artigos publicados de janeiro de 1985 a outubro de 2015, que apresentavam uma ou mais das palavras-chave listadas a seguir, foram considerados: “*Bothrops* sp.”, “*Bothrops atrox*”, “snake venom”, “snakebite”, “hemorrhagic activity”, “antiofídico plants”, “antihemorrhagic plants”, “folk medicine”, “*Connarus* sp.”, “*Connarus favosus*”, ou suas respectivas versões em português, quando aplicadas.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil

No Brasil, a média de acidentes ofídicos notificados pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) está entre 27.000 e 29.000 anualmente e as principais espécies causadoras,

em ordem decrescente, são as pertencentes aos gêneros *Bothrops* sp., *Crotalus* sp., *Lachesis* sp. e *Micrurus* sp. (BOCHNER et al., 2014; DA-SILVA et al., 2015; FEITOSA et al., 2015).

A maioria das vítimas é do sexo masculino e com idade entre 20 a 59 anos, consequentemente, nesta faixa etária está o maior número de óbitos (BOCHNER et al., 2014; DA-SILVA et al., 2015), entretanto, em pacientes com idade acima de 60 anos aumenta a gravidade do quadro clínico e o risco de letalidade (DA-SILVA et al., 2015; FEITOSA et al., 2015). Os locais anatômicos mais acometidos nos acidentes são os pés e pernas, os quais representam cerca de 90% (WALDEZ; VOGT, 2009; FEITOSA et al., 2015).

Nas comunidades ribeirinhas, a população é mais susceptível aos acidentes ofídicos durante o período de cheia dos rios e a maioria dos acidentes está relacionada a atividades econômicas como extrativismo, agricultura, caça e também com a falta de equipamentos de segurança para a realização dessas atividades, por exemplo, luvas e calçados apropriados (BORGES et al., 1999; DOS-SANTOS, 2009; WALDEZ; VOGT, 2009).

No país, mais da metade da população recebeu atendimento médico em até 3 horas após a picada, com exceção da Região Norte, onde 42% obtiveram atendimento dentro desse prazo, porém, a maioria só foi atendida 6 horas após a picada (BOCHNER et al., 2014). A situação ainda é mais precária quando se trata das populações ribeirinhas, nas quais apenas 25% dos pacientes receberam a soroterapia em tempo igual ou superior a 24 horas, após a ocorrência do acidente (WALDEZ; VOGT, 2009).

Segundo estudo do perfil dos acidentes ofídicos no Brasil entre 2001 e 2010, o ano com maior número de notificações foi 2010. O acréscimo anual do número de casos de ofidismo não se deve apenas ao aumento do número de acidentes, mas também às melhorias no sistema de notificação e informação de saúde. Entretanto, é provável que as dificuldades de acesso aos serviços de saúde e problemas de comunicação ainda podem contribuir para a subnotificação dos acidentes, especialmente na Região Norte, onde as vítimas têm que percorrer longas distâncias, com transportes precários, entre o local do acidente e o atendimento médico e por vias de acesso como a fluvial, ou estradas sem revestimento (BORGES et al., 1999; DOS-SANTOS, 2009; BOCHNER et al., 2014). Além disso, podem ocorrer subnotificações quando pacientes que apresentam sintomas leves de picada, moram em áreas de difícil acesso e não relatam o caso aos hospitais ou, ainda, quando o quadro do envenenamento é muito grave levando o paciente a óbito, no caminho para o atendimento médico (FEITOSA et al., 2015). Por exemplo, para as populações ribeirinhas e indígenas, o difícil acesso aos centros de saúde para tratamento de lesões por animais peçonhentos resulta em um número de casos notificados, muito inferior ao número real (WEN et al., 2015).

A taxa elevada de acidentes pode também ser explicada pela enorme capacidade que as serpentes têm de se adaptarem a uma gama de ambientes, o que lhe permite habitar áreas florestais e áreas ocupadas por seres humanos, resultantes da urbanização. Nos centros urbanos, tanto assentamentos precários nas periferias das cidades, como bairros mais abastados próximos de áreas de preservação natural, podem oferecer abrigo para as serpentes. Portanto, os acidentes ofídicos não são problemas apenas nas áreas rurais e essas condições, junto ao ecoturismo, tem contribuído para um fenômeno chamado "Urbanização das picadas de serpentes" (BOCHNER et al., 2014).

No Estado do Amazonas, foi conduzido um estudo que analisou 9.191 notificações de acidentes ofídicos, entre os anos de 2007 e 2012, os quais 70% estavam ligados a áreas rurais e 55% ligados a atividades relacionadas ao trabalho. O soro antiofídico foi administrado em 93% dos pacientes que sofreram picadas de serpentes do gênero *Bothrops* sp., entretanto, as doses administradas de soro foram menores do que as recomendadas, principalmente em envenenamentos considerados graves (52%), isso pode ser devido à falta de fornecimento de soro, impondo ao profissional de saúde o "acionamento" desse imunobiológico para o atendimento de futuras vítimas. Como mencionado anteriormente, muitas vezes, os acidentados só conseguem acesso ao tratamento horas ou mesmo dias após o evento, refletindo na dificuldade em prever a quantidade de antiveneno necessária no momento da admissão dos pacientes. Além disso, a falta de informação adequada sobre a dosagem de antiveneno a ser administrado, por parte dos profissionais da área médica, em ambientes remotos e a indisponibilidade recorrente de soro nessas áreas rurais contribuem para a má distribuição e armazenamento desses imunobiológicos (FEITOSA et al., 2015). Os antivenenos são geralmente disponíveis nos hospitais municipais e não distribuídos aos postos de saúde periféricos, uma razão para isso é que os antivenenos devem ser administrados por via endovenosa e isso pode causar, ao

paciente, reações adversas graves, como o choque anafilático, os quais não podem ser revertidos em postos de saúde (WEN et al., 2015).

A produção de soro suficiente para lidar com o número médio anual dos casos não garante necessariamente a sua disponibilidade nas unidades de saúde durante todos os meses do ano. As grandes flutuações no número de acidentes ao longo dos anos podem gerar escassez temporária de soro, que não pode ser prevista em uma análise baseada na média de valores anuais (BOCHNER et al., 2014). WEN e colaboradores (2015) relatam que a Região Norte do Brasil é carente de profissionais de saúde capazes de diagnosticar, tratar e notificar os acidentes ofídicos e, isso provavelmente, contribuiu para o agravamento do ofidismo na região. Outro fator importante é a identificação da espécie de serpente que é essencial para o diagnóstico e tratamento específico do envenenamento, porém, poucos pacientes levam o animal causador do acidente no momento do primeiro atendimento (FEITOSA et al., 2015; WEN et al., 2015).

3.2. Serpentes

Várias espécies de serpentes, pertencentes às famílias Colubridae, Elapidae e Viperidae, são encontradas na região Norte do Brasil. Algumas serpentes da família Colubridae, apesar de classicamente serem consideradas não-peçonhentas por possuírem presas do tipo opistóglifas, são capazes injetar o veneno produzido em suas glândulas, causando acidentes graves em suas vítimas, como é o caso da cobra-verde *Phylodryas viridissimus* (CAMPBELL et al., 2004). As serpentes conhecidas como corais-verdadeiras são distribuídas, no Brasil, nos gêneros *Leptomicrurus* sp. (três espécies) e *Micrurus* sp. (vinte e quatro espécies) que pertencem à família Elapidae. Dessas espécies, grande parte é encontrada na Região Amazônica, entretanto, apesar da abundância de espécies são raros os casos de acidentes registrados com essas serpentes (BERNARDE, 2011).

As serpentes responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos pertencem à família Viperidae com representante nos gêneros *Bothrocophias* sp., *Bothrops* sp., *Crotalus* sp., *Lachesis* sp. A espécie *L. muta*, conhecida como surucucu-pico-de-jaca ou surucucu, é considerada a maior serpente peçonhenta do Novo Mundo. No Brasil é encontrada nas zonas de florestas Amazônica e Atlântica e é responsável por cerca de 10% dos acidentes confirmados (DOS-SANTOS, 2009; BERNARDE, 2011). A cascavel e suas subespécies apresentam muitas controvérsias quanto à sua classificação, ora sendo descritas como *Crotalus durissus* ora como *Caudisona durissa*. Estas serpentes são amplamente distribuídas no território brasileiro e no Norte do Brasil são encontradas na região de lavrado do Estado de Roraima, nas áreas de campo da Ilha do Marajó (PA) e em Humaitá (AM). Em um estudo realizado entre 1992 e 1998 no estado de Roraima foi constatada a ocorrência de 13,2% de acidentes crotálicos (NASCIMENTO, 2000), para outras localidades não foram encontrados registros na literatura.

Bothrops e *Bothrocophias* conhecidas como jararacas são distribuídas em toda Região Amazônica e, em algumas áreas podem ser encontradas até cinco espécies diferentes (DOS-SANTOS et al., 1995; DOS-SANTOS, 2009). Apesar desse conhecimento, a maioria dos acidentes são atribuídos para a *Bothrops atrox* (Figura 1), popularmente conhecidas por diferentes sinônimos como: jararaca-do-norte, jararaca-do-rabo-branco, surucucurana, as formas juvenis são denominadas jipoboia e é comum confundirem espécimes maiores com surucucu-pico-de-jaca. *B. atrox* (Figura 1) foi descrita pelas populações ribeirinhas como a espécie mais agressiva, reagindo com ataque a aproximações humanas. Em relatos de picados foi constatado que menos da metade de suas vítimas alegaram ter realmente tocado na serpente (WALDEZ; VOGT, 2009), visto que essas serpentes possuem um padrão de coloração muito variável e frequentam beiras de rios, córregos, igarapés e até arbustos (DOS-SANTOS et al., 1995; MELGAREJO, 2009).

3.3. Atividades dos venenos de *Bothrops* sp. e *Bothrops atrox*

Nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp. 90% de seu peso seco é constituído por proteínas como metaloproteínases (SVMP), L-aminoácido oxidase (LAAO), “lectina-like” do tipo C (CLECL), serinaproteases (SVSP), fosfolipases (PLA₂), dentre outras (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; SOUSA et al., 2013). Apesar da similaridade na composição, os venenos de serpentes de um mesmo gênero, geralmente apresentam variações inter e intraespecíficas. As variações intraespecíficas

podem ocorrer devido a fatores sazonais, ontogenéticos, geográficos (interpopulacionais) e nutricionais (CHIPPAUX et al., 1991; FURTADO et al., 1991; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009; CALVETE et al., 2011).

As principais atividades fisiopatológicas induzidas pelo veneno botrópico são inflamação aguda local, distúrbios na coagulação e hemorragia local e sistêmica. A inflamação aguda é caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios (eicosanoides, citocinas, quimiocinas, anafilatoxinas - C3a, C5a, dentre outras), promovendo a expressão de moléculas de adesão celular, recrutamento de células, dentre outros eventos. As células fagocíticas como monócitos (macrófago residentes) e neutrófilos recrutados para o local, exercem as suas funções liberando espécies reativas de oxigênio, que podem potencializar o dano causado pelo veneno (TEIXEIRA et al., 2009), visto que as defesas antioxidantes são comprometidas pelo estresse oxidativo, após picada destas serpentes (CARDOSO et al., 2009b). No processo de inflamação local há a formação de trombos na microvasculatura devido à atividade coagulante, seguindo de hipóxia, agravamento do edema e necrose tecidual. O veneno possui componentes ativadores da coagulação sanguínea como a trombina-símile que cliva o fibrinogênio formando fibrina intravascular levando à incoagulabilidade sanguínea (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

As principais complicações locais induzidas pelo envenenamento são infecções locais, necrose e a Síndrome Compartimental (Figura 1). As infecções locais apresentadas na forma de abscessos, celulite e erisipela resultam do crescimento de bactérias da cavidade oral da serpente ou da própria pele da vítima, ou do meio ambiente e os riscos de dano por estes agentes aumentam quanto maior for o tempo entre o acidente e o tratamento soroterápico (OTERO et al., 2002; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009). O tratamento médico de infecção secundária, abscessos, necrose e Síndrome Compartimental tem sido controverso, em parte devido à falta de padronização sobre procedimentos e protocolos. Além disso, o atraso no atendimento médico juntamente com o uso de substâncias caseiras podem agravar o quadro clínico do acidentado levando à complicações locais muitas vezes irreversíveis (WEN et al., 2015).



Figura 1 - Aspectos das lesões locais ocasionadas por envenenamento botrópico. A) *Bothrops atrox* coletada na Floresta Nacional do Tapajós-FLONA, Santarém, PA (foto: Diana Amazonas); B) Inchaço e bolhas; C) Fasciotomia decorrente da Síndrome Compartimental; D) Edema, necrose e gangrena no quarto dedo; E) Paciente com dedo amputado e em recuperação. (fotos B, C, D e E: pacientes da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM. Figura adaptada de Wen et al., 2015).

A atividade hemorrágica é um dos principais sinais do envenenamento botrópico, resultante da ação de metaloproteinasas (SVMP) dependentes de zinco que podem romper o endotélio vascular, degradando componentes da matriz extracelular, além de agirem como inibidoras de agregação plaquetária (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009). As SVMP são classificadas em grupos de acordo com a composição de domínio (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009; BALDO et al., 2010). O grupo das SVMP P-I é composto por enzimas que apresentam apenas o domínio metaloproteinase, com baixa ou nenhuma atividade hemorrágica. O grupo P-II inclui enzimas que contêm um domínio desintegrina e um domínio metaloproteinase. As SVMP pertencentes ao grupo P-III compreendem metaloproteinase, com domínio desintegrina-símile e domínio rico em cisteína em uma única cadeia polipeptídica, e induzem alta atividade hemorrágica. Por fim, as SVMP da classe P-IV são heterodímeros, com uma subunidade correspondente a uma cadeia de P-III ligado a uma outra com domínio semelhante à lectina do tipo C (BJARNASON; FOX, 1983; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009).

As SVMP dos tipos P-I e P-III podem degradar os componentes da membrana basal vascular como laminina, colágeno tipo IV, nidogênio, interferindo nos componentes envolvidos na adesão entre células endoteliais e a matriz extracelular, levando ao surgimento de alterações dos vasos capilares e afetando a organização dos filamentos de actina, resultando em morte celular por apoptose. Portanto, a hidrólise de componentes da membrana basal vascular causada pelas SVMP pode afetar a estabilidade do endotélio, resultando em hemorragia. Entretanto, a atividade catalítica ocorre de forma parecida tanto em SVMP hemorrágicas (P-III) quanto não-hemorrágicas (P-I), indicando que essa hidrólise não é o único mecanismo para o dano vascular induzido por componentes hemorrágicos, presentes nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp. (BALDO et al., 2010). A hemorragia local foi investigada pela injeção de várias metaloproteinasas hemorrágicas purificadas e na maioria dos casos, as células endoteliais dos vasos sanguíneos capilares foram afetadas rapidamente, ocasionando perda citoplasmática, resultando em camadas de células endoteliais menos espessas criando lacunas na sua continuidade, por onde ocorreram os extravasamentos de eritrócitos e de outros componentes sanguíneos. As primeiras alterações ultra-estruturais nos vasos sanguíneos capilares foram a queda do número de vesículas pinocitóticas e um descolamento de células endoteliais a partir da lâmina basal. Além disso, foram observadas pequenas projeções citoplasmáticas ou bolhas nos vasos (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

Em um estudo foram comparados, simultaneamente, a composição e reatividade de venenos coletados de seis espécies de serpentes ao antiveneno botrópico, distribuídas em três clados filogenéticos distintos: *Bothrops*, *Bothropoides* e *Rhinocerophis*. Os resultados mostraram que as SVMPs de classe III (P-III) são os imunógenos predominantes nos venenos de serpentes do complexo *Bothrops*. Além disso, as SVMPs de todos os venenos botrópicos estudados foram reconhecidas de forma cruzada pelos anticorpos do antiveneno independentemente da sua inclusão no “pool” de imunização. Esta seria uma evidência sobre a eficácia do antiveneno, visto que as SVMPs P-III estão relacionadas com os sintomas importantes de envenenamentos locais e sistêmicos, tais como hemorragia, ativação de fatores de coagulação e inibição da agregação plaquetária (SOUSA et al., 2013). No entanto, os altos títulos de anticorpos ou reações-cruzadas obtidas em ensaios imunoenzimáticos para os antivenenos, não indicam eficácia na neutralização das atividades dos venenos como é observada em testes in vivo. Portanto, a inclusão ou exclusão de venenos em “pool” de imunização para obtenção de imunobiológicos não podem ser baseadas apenas em ensaios in vitro.

Como exposto, os efeitos sistêmicos causados pelo veneno de *Bothrops atrox* são normalmente neutralizados após a administração do soro antibotrópico, porém, a neutralização dos constituintes do veneno indutores de danos locais é limitada (CARDOSO et al., 2009a). Isto levou à necessidade de investigar novos componentes que possam inibir esses danos locais, como a hemorragia. Diversos estudos tem avaliado o potencial antiofídico de plantas, seja como coadjuvantes à soroterapia ou como medicamento alternativo quando não há disponibilidade do antiveneno (OTERO et al., 2000; CARDOSO, 2009; MOURA et al., 2015) e esse tema será abordado no tópico a seguir.

3.4. Espécies vegetais com ação anti-hemorrágica contra veneno de serpentes *Bothrops* sp.

Os primeiros relatos de espécies com propriedades antiofídicas foram feitos no século XIX, mas a partir da década de 1970, além de citar o uso popular, os efeitos das plantas passaram a ser investigados biológica, bioquímica e farmacologicamente, por meio de experimentos controlados (VILAR et al., 2005). Nos últimos 30 anos houve um expressivo avanço nos estudos com plantas antiofídicas, e no levantamento bibliográfico realizado nos sites de busca foram encontrados 99 artigos científicos com plantas testadas frente às diversas atividades biológicas induzidas pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp.

Do total desses 99 trabalhos, 36 artigos (36,3%) (Tabela 1), avaliaram o potencial de espécies vegetais frente à atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops* sp., tais como: *Bothrops jararaca* (16,94%), *Bothrops jararacussu* (15,2%), *Bothrops atrox* (11,8%), *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops neuwiedi* (10,1%, cada espécie), *Bothrops asper*, *Bothrops pauloensis*, metaloproteases isoladas (6,7% cada) e *Bothrops pirajai* (5%). Os países de origem dos trabalhos foram Brasil 83,3%, Colômbia 8,3%, Costa Rica 5,5% e Argentina 2,7%. No total, foram estudadas 163 espécies de plantas, pertencentes a 70 famílias. Todas as partes das plantas foram avaliadas, porém as mais representativas foram: folhas (36,8%), cascas (12,2%), raízes (10,5%), caule (8,7%) e sementes (5,2%). As formas de uso tradicional das espécies foram infusão (33,3%), cataplasma (27,7%), decocção (16,6%), chá (11%) e tintura (11%). O tipo de extrato testado nos artigos foram: extrato aquoso (35,4%), compostos isolados (20,8%), extrato etanólico (10,4%), extrato metanólico (6,2%), frações (8,3%), extrato diclorometano, hidroalcolico e hexânico (4,1% cada), maceração, acetato e óleo essencial (2% cada). A metodologia utilizada para avaliação dos extratos das plantas foram: pré-incubação (69,5%), pós-tratamento via oral (10,8%), pré-tratamento via oral (8,6%), via intradérmica (4,3%), aplicação tópica, via subcutânea e via intraperitoneal (4,3%, cada uma). Quanto ao percentual de inibição das espécies vegetais contra a atividade hemorrágica dos venenos de *Bothrops* sp., 23,1% bloquearam totalmente, 46,1% parcialmente e 30,7% não foram capazes de reduzir a hemorragia. Quando avaliado o percentual de inibição de cada tratamento, os resultados foram: Pré-incubação (bloqueio total - 28,1%, parcial - 36,3%, e ausente- 35,6%); no Pré-tratamento, por via oral, só houve bloqueio parcial; no Pós-tratamento, por via oral, 13,3% das espécies bloquearam parcialmente, em 80% das espécies o bloqueio foi inferior a 20% e em 6,6% não houve bloqueio da hemorragia; no protocolo de Aplicação Tópica só houve bloqueio parcial, assim como nas vias intradérmica e intraperitoneal.

Tabela 1 - Lista de espécies vegetais com ação anti-hemorrágica contra peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* sp.

Espécie planta/Família	País de origem	Espécie de serpente	Parte da planta	Utilização popular	Tipo de extrato	Metodologia utilizada	Inibição da hemorragia	Autores
<i>Hypericum brasiliense*</i>	Brasil	<i>B. jararaca</i>	Planta inteira	*	Etanólico	Pré-incubação	Total	Assafim et al. (2011)
<i>Cissampelos parreira</i> (Menispermaceae)	Costa Rica	<i>B. asper</i>	Folhas	Cataplasma	Aquoso	Pré-incubação	Parcial	Badilla-Baltodano et al. (2008)
<i>Mandevilla velutina</i> (Apocynaceae)	Brasil	<i>B. jararacussu</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. alternatus</i> , <i>B. pirajai</i>	Folhas e caule	Infusão	Aquoso	Pré-incubação	Parcial (<i>B. jararacussu</i>) Total (<i>B. moojeni</i> , <i>B. alternatus</i> , <i>B. pirajai</i>)	Biondo et al. (2003)
<i>Brosimum guianensis*</i>	Brasil	<i>B. atrox</i>	Folhas	Cataplasma	Aquoso	Pré-incubação	Parcial	Bittencourt et al. (2014)
<i>Musa paradisiaca</i> L. (Musaceae)	Brasil	<i>B. jararacussu</i>	Caule	*	Maceração	Pré-incubação	Parcial	Borges et al. (2005)
<i>Casearia Sylvestris</i> (Flacourtiaceae)	Brasil	<i>B. asper</i> , <i>B. jararacussu</i> , <i>B. neuwiedi</i> , <i>B. pirajai</i>	Folhas	*	Aquoso	Pré-incubação	Parcial	Borges et al. (2001)
<i>Bidens pilosa</i> , <i>Mikania guaco</i> , <i>Neurolaena lobata</i> , <i>Vernonia patens</i> (Asteraceae), <i>Asclepias curassavica</i> (Asclepiadaceae), <i>Annona purpurea</i> , <i>Rollinia mucosa</i> (Annonaceae), <i>Allamanda cathartica</i> (Apocynaceae), <i>Aristolochia grandiflora</i> (Aristolochiaceae), <i>Bursera simaruba</i> (Burseraceae), <i>Tabebuia palmeri</i> (Bignoniaceae), <i>Clusia palmana</i> , <i>Clusia torresii</i> , <i>Hypericum strictum</i> , <i>Hypericum irazuensis</i> , <i>Tovomita</i> sp. (Clusiaceae), <i>Fevillea cordifolia</i> (Cucurbitaceae), <i>Viburnum costaricanum</i> (Caprifoliaceae), <i>Terminalia oblonga</i> (Combretaceae), <i>Zebrina pendula</i> (Commelinaceae), <i>Croton draco</i> (Euphorbiaceae), <i>Casearia silvestres</i> (Flacourtiaceae), <i>Ocotea holdridgeana</i> , <i>Ocotea valerianoides</i> , <i>Ocotea insularis</i> , <i>Phoebe brenesil</i> , <i>Persea americana</i> var Hass (Lauraceae), <i>Satureja brownei</i> (Lamiaceae), <i>Platymiscium pleiostachyum</i> , <i>Senna emarginata</i> , <i>Gliricidia sepium</i> (Leguminosae), <i>Sansevieria guineenses</i> (Liliaceae), <i>Buddleia nítida</i> (Loganiaceae), <i>Cedrela tonduzii</i> (Meliaceae), <i>Dorstenia contrajerba</i> (Moraceae), <i>Virola koschnyi</i> (Myristicaceae), <i>Pimenta dioica</i> (Myrtaceae), <i>Pimenta darienensis</i> (Piperaceae), <i>Petiveria alliacea</i> (Phytolacaceae), <i>Genipa americana</i> (Rubiaceae), <i>Picramnia antidesma</i> , <i>P. teapensis</i>	Costa Rica	<i>B. asper</i>	Folhas, madeira, botões florais, flores, córtex, látex, raiz, semente	*	Hidroalcoólicos (etanol/água)	Pré-incubação	Total (10 plantas), Parcial (8 plantas), Ausente (30 plantas)	Castro et al. (1999)

(Simaroubaceae), <i>Sapindus saponária</i> (Sapindaceae), <i>Smilax cuculmeca</i> (Smilacaceae), <i>Citharexylum macrodenium</i> , <i>Duranta repens</i> , <i>Stachytarpheta jamaicensis</i> , <i>Verbena litoralis</i> (Verbenaceae)								
<i>Pentaclethra macroloba</i> (Mimosaceae)	Brasil	<i>B. atrox</i> , <i>B. jararacussu</i> , pool de <i>Bothrops</i> sp. (Instituto Butantan)	Cascas	Cataplasma	Aquoso	Pré-incubação	Total (<i>B. jararacussu</i>), Parcial (<i>B. atrox</i> , pool de <i>Bothrops</i> sp.)	Da-Silva et al. (2005)
<i>Sapindus saponária</i> (Sapindaceae)	Brasil	<i>B. jararacussu</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. alternatus</i>	*	*	Frações liofilizadas	Pré-incubação	Parcial	Da-Silva et al. (2012)
<i>Pentaclethra macroloba</i> (Mimosaceae)	Brasil	<i>B. atrox</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. neuwiedi</i> , <i>B. pirajai</i>	Cascas	Cataplasma	Composto isolado	Pré-incubação	Parcial	Da-Silva et al. (2007)
<i>Clusia fluminensis</i> (Clusiaceae Lindl. = Guttiferae Juss.)	Brasil	<i>B. jararaca</i>	*	*	Diclorometano, hexânico, metanólico, acetato, compostos isolados	Pré-incubação e via intradérmica	Parcial	De Oliveira et al., 2014
<i>Croton urucurana</i> Baillon (Euphorbiaceae)	Brasil	<i>B. jararaca</i>	Cascas	*	Aquoso e frações	Pré-incubação	Parcial	Esmeraldino et al. (2005)
<i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Euphorbiaceae)	Brasil	<i>B. jararaca</i>	Folhas	Chá	Aquoso	Pré-tratamento (via oral)	Parcial	Félix-Silva et al. (2014)
<i>Combretum leprosum</i> (*)	Brasil	<i>B. jararaca</i>	Raízes	Infusão e decocção	Etanólico e composto isolado (ácido arjunólico)	Pré-incubação, pré e pós-tratamento (via oral)	Total (pré-incubação com extrato e ácido arjunólico), Parcial (pré-tratamento com o extrato)	Fernandes et al. (2014)
<i>Serjania erecta</i> (Sapindaceae)	Brasil	<i>B. jararacussu</i>	Caule e folhas	*	Metanólico e frações	Pré-incubação	Parcial	Fernandes et al. (2011)
<i>Curcuma longa</i> (Zingiberaceae)	Brasil	<i>B. jararaca</i>	Raízes	*	Composto isolado	Pré-incubação	Parcial	Ferreira et al. (1992)
<i>Renealmia alpinia</i> (Zingiberaceae)	Colômbia	<i>B. asper</i>	Folhas	*	Diclorometano e composto isolado	Pré-incubação	Parcial	Gómez-Betancur et al. (2014)
<i>Casearia mariquitensis</i> (Flacourtiaceae)	Brasil	<i>B. neuwiedi</i> , <i>B. pauloensis</i>	Folhas	*	Aquoso	Pré-incubação	Parcial	Izidoro et al. (2003)
<i>Baccharis trimera</i> (Asteraceae)	Brasil	<i>Bothrops</i> sp. E	Partes	*	Composto	Pré-incubação	Parcial	Januário et

			metaloprotease (Bjussu-MP-I)	aéreas		isolado			al. (2004)
<i>Mikania glomerata</i> (Asteraceae)	Brasil	<i>B. jararacussu</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. alternatus</i> , <i>B. neuwiedi</i> ,	Folhas, Caules e raízes		Infusão	Aquoso	Pré-incubação	Parcial	Maiorano et al. (2005)
<i>Eclipta prostrata</i> (Asteraceae)	Brasil	<i>B. jararaca</i>	Parte aérea	*		Aquoso e compostos isolados	Pré-incubação	Parcial	Melo et al. (1994)
<i>Curcuma longa</i> L. (Zingiberaceae) e <i>Aristolochia cymbifera</i> L. (Aristolochiaceae)	Brasil	<i>B. alternatus</i>	Rizomas e folhas	*		Aquoso-isopropanol	Aplicação tópica e subcutânea	Parcial	Melo et al. (2007)
<i>Schizolobium parahyba</i> (Caesalpinoideae)	Brasil	<i>B. pauloensis</i>	Folhas		Chá e infusão	Aquoso	Pré-incubação e pós-tratamento (via oral)	Total (pré-incubação), Parcial (pós-tratamento)	Mendes et al. (2008)
<i>Bombacopsis glabra</i>	Brasil	<i>B. pauloensis</i> e <i>jararagina</i>	Casca e raízes	*		Hexânico e composto isolado	Pré-tratamento (via intradérmica)	Parcial	Mendes et al. (2013)
<i>Bellucia dichotoma</i> Cogn. (Melastomataceae)	Brasil	<i>B. atrox</i>	Cascas		Chá por decocção	Aquoso	Pré-incubação, Pré e pós-tratamento (via oral)	Total (pré-incubação), Parcial (pré-tratamento), Ausente (pós-tratamento)	Moura et al. (2014)
<i>Bellucia dichotoma</i> (Melastomataceae), <i>Aniba fragrans</i> (Lauraceae), <i>Annona montana</i> (Annonaceae), <i>Connarus favosus</i> (Connaraceae), <i>Justicia pectoralis</i> (Acanthaceae), <i>Plathymenia reticulata</i> (Fabaceae), <i>Philodendron megalophyllum</i> (Araceae), <i>Cassia fistula</i> (Fabaceae), <i>Libidibia férrea</i> (Fabaceae), <i>Crataeva benthamii</i> (Capparaceae), <i>Kalanchoe brasiliensis</i> (Crassulaceae), <i>Dipterix odorata</i> (Fabaceae)	Brasil	<i>B. jararaca</i>	Cascas, folhas, entrecascas, sementes		Chá (decocção e infusão), tintura, cataplasma	Aquosos	Pré-incubação	Total (4 plantas), Parcial (6 plantas) Ausente (2 plantas)	Moura et al. (2015)
<i>Mikania glomerata</i> (Asteraceae)	Brasil	<i>B. jararaca</i>	Folhas	*		Extrato hidroalcoólico	Pré-incubação	Parcial	Mourão et al. (2014)
<i>Mouriri pusa</i> , <i>Byrsonima crassa</i> , <i>Davilla elliptica</i> , <i>Strychnos pseudoquina</i>	Brasil	<i>B. jararaca</i>	Folhas	*		Extrato metanólico e frações	Pré-incubação	Total (3 plantas), Parcial (1 planta)	Nishijima et al. (2009)
<i>Bauhinia forficata</i> (Leguminosae)	Brasil	<i>B. jararacussu</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. alternatus</i> , <i>B. neuwiedi</i> ,	Partes aéreas	*		Extrato aquoso	Pré-incubação	Parcial	Oliveira et al. (2005)

75 espécies (vide tabela 2)	Colômbia	<i>B. atrox</i>	Planta inteira, ramos, caule, rizomas, frutos, cascas, raízes, sementes	*	Extrato etanólico	Pré-incubação, Pós-tratamento (via oral, intravenoso e intraperitoneal)	Total (12 plantas), Parcial (31 plantas), Muito baixa (15 plantas) Ausente (17 plantas)	Otero et al. (2000)
<i>Renealmia alpinia</i> (Zingiberaceae)	Colômbia	Batx-I (metaloproteinase isolada de <i>B. atrox</i>)	Folhas	*	Extrato etanólico	Pré-incubação	Parcial	Patiño et al. (2012)
<i>Humirianthera ampla</i> (Icacinaceae)	Brasil	<i>B. atrox</i>	Raízes	Tintura	Extrato etanólico	Pré-incubação, Pré e pós-tratamento (via oral)	Parcial	Strauch et al. (2013)
<i>Nectandra angustifolia</i>	Argentina	<i>B. neuwiedi diporus</i>	Folhas	*	Óleo essencial	*	*	Torres et al. (2011a)
<i>Solanum campaniforme</i> (Solanaceae)	Brasil	<i>B. pauloensis</i>	Folhas	*	Compostos isolados	Pré-incubação	Parcial	Torres et al. (2011b)
<i>Schizolobium parahyba</i> (Fabaceae)	Brasil	<i>B. alternatus e B. moojeni</i>	Folhas	*	Extrato aquoso e frações	Pré-incubação	Total	Vale et al. (2008)
<i>Schizolobium parahyba</i> (Fabaceae)	Brasil	<i>B. jararacussu e Bjussu MP-I</i>	Folhas	Infusão	Extrato aquoso e composto isolado	Pré-incubação	Parcial	Vale et al. (2011)

Dentre os artigos encontrados no levantamento, o de OTERO et al. (2000) (Tabela 2), chamou atenção por terem avaliado 75 espécies vegetais (extrato etanólico) frente à atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox*, seguindo protocolo de pré-incubação. Os resultados mostraram que 12 dessas espécies bloquearam 100%, 31 parcialmente, 15 bloquearam levemente e em 17 não houve bloqueio da atividade hemorrágica. As 12 espécies que bloquearam 100% essa atividade na pré-incubação, foram avaliadas em pré-tratamento pelas vias oral, intraperitoneal e intravenosa. Os resultados obtidos de bloqueio não ultrapassaram 25% e algumas espécies não foram capazes de bloquear a atividade hemorrágica do veneno. Os resultados vão de encontro ao que foi observado em experimentos do nosso grupo com a *Connarus favosus*, que bloqueou 100% a atividade hemorrágica quando o extrato foi pré-incubado com o veneno de *Bothrops atrox*, e quando avaliada por via oral teve redução máxima de 66,3%. A redução obtida de 100% na pré-incubação das atividades hemorrágica, fosfolipásica e coagulante são devidas à presença de componentes quelantes nos extratos vegetais, tais como taninos condensados e hidrolisáveis, presentes em grandes quantidades no extrato aquoso de *Connarus favosus*.

Tabela 2 - Lista de espécies vegetais testadas frente à atividade hemorrágica do veneno de serpentes *Bothrops atrox* seguindo protocolo de pré-incubação. Inibição Total (100%); Parcial (acima de 25%); Levemente (até 25%); Ausente (zero). Tabela adaptada de Otero et al., 2000.

Espécie de planta	Família	Parte utilizada	Inibição da hemorragia
<i>Justicia secunda</i>	Acanthaceae	Planta inteira	Ausente
<i>Achyranthes áspera</i>	Amaranthaceae	Planta inteira	Levemente
<i>Allamanda catártica</i>	Apocynaceae	Folhas, ramos e caule	Parcial
<i>Alocasia cucullata</i>	Araceae	Rizomas	Levemente
<i>Dieffenbachia longispatha</i>		Planta inteira	Ausente
<i>Dracontium croatii</i>		Rizomas	Levemente
<i>Philodendron tripartitum</i>		Folhas e ramos	Total
<i>Aristolochia grandiflora</i>	Aristolochiaceae	Planta inteira	Parcial
<i>Aristolochia pilosa</i>		Raízes	Levemente
<i>Adenostemma lavenia</i>	Asteraceae	Planta inteira	Levemente
<i>Clibadium silvestre</i>		Planta inteira	Levemente
<i>Erechtites valerianaefolia</i>		Folhas, ramos e caule	Ausente
<i>Mikania guaco</i>		Planta inteira	Levemente
<i>Neurolaena lobata</i>		Folhas, ramos e caule	Parcial
<i>Pseudoelephantopus spicatus</i>		Planta inteira	Parcial
<i>Crescentia cujete</i>	Bignoniaceae	Frutos verdes	Levemente
<i>Macfadyena unguicati</i>		Planta inteira	Ausente
<i>Tabebuia rósea</i>		Casca do caule	Total
<i>Bixa orellana</i>	Bixaceae	Folhas e ramos	Total
<i>Tournefortia cuspidata</i>	Boraginaceae	Folhas, ramos e caule	Ausente
<i>Pereskia bleo</i>	Cactaceae	Folhas e caule	Ausente
<i>Brownea rosademente</i>	Caesalpiniaceae	Casca do caule	Total
<i>Senna dariensis</i>		Planta inteira	Total
<i>Ipomoea cairica</i>	Convolvulaceae	Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Costus guanaiensis</i>		Caule	Ausente
<i>Costus lasius</i>		Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	Folhas, ramos e caule	Ausente
<i>Phyllanthus acuminatus</i>	Euphorbiaceae	Folhas e ramos	Levemente
<i>Desmodium adscendens</i>	Fabaceae	Planta inteira	Levemente
<i>Irlbachia alata</i>	Gesneriaceae	Folhas e ramos	Levemente
<i>Columnnea kalbreyeriana</i> ,		Planta inteira	Parcial
<i>Columnnea pulcherrima</i>		Planta inteira	Levemente
<i>Episcia dianthiflora</i>		Planta inteira	Levemente
<i>Xiphidium caeruleum</i>	Haemodoraceae	Planta inteira	Levemente
<i>Heliconia curtispatha</i>	Heliconiaceae	Rizomas	Total
<i>Trichomanes elegans</i>	Hymenophyllaceae	Planta inteira	Total
<i>Ocimum basilicum</i> ,	Lamiaceae	Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Ocimum micranthum</i>		Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Hyptis capitata micranthum</i>		Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Strychnos xinguensis</i>	Loganiaceae	Caule	Parcial
<i>Struthanthus orbicularis</i>	Loranthaceae	Folhas e ramos	Total
<i>Sida acuta</i>	Malvaceae	Planta inteira	Parcial

<i>Odontocarya tenacíssima</i>	Menispermaceae	Planta inteira	Ausente
<i>Siparuna thecaphora</i>	Monimiaceae	Folhas, ramos e caule	Parcial
<i>Castilla elastica</i> Sessé	Moraceae	Folhas, ramos e caule	Parcial
<i>Ficus nymphaeifolia</i>		Folhas e ramos	Parcial
<i>Passiflora quadrangulares</i>	Passifloraceae	Folhas e ramos	Levemente
<i>Petiveria alliacea</i>	Phytolaccaceae	Planta inteira	Ausente
<i>Peperomia elsana</i>	Piperaceae	Folhas e ramos	Parcial
<i>Piper arboreum</i>		Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Piper auritum</i> ,		Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Piper hispidum</i> ,		Planta inteira	Ausente
<i>Piper longivillosum</i> ,		Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Piper marginatum</i> ,		Folhas, ramos e caule	Ausente
<i>Piper multiplinervium</i> ,		Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Piper peltatum</i> ,		Folhas, ramos e caule	Parcial
<i>Piper pulchrum</i> ,		Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Piper reticulatum</i> ,		Folhas, ramos e caule	Ausente
<i>Piper cf. Spoliatum</i> ,		Folhas, ramos e caule	Ausente
<i>Piper tricuspe</i>		Planta inteira	Total
<i>Pleopeltis percussa</i>	Polypodiaceae	Folhas, ramos e caule	Total
<i>Gonzalagunia panamensis</i> ,		Raízes	Levemente
<i>Psychotria ipecacuanh</i> ,		Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Psychotria poeppigiana</i>	Rubiaceae	Frutos maduros	Total
<i>Citrus limon</i>	Rutaceae	Planta inteira	Ausente
<i>Lindernia difusa</i>	Scrophulariaceae	Planta inteira	Levemente
<i>Scoparia dulcis</i>		Planta inteira	Parcial
<i>Selaginella articulata</i>	Selaginellaceae	Planta inteira	Ausente
<i>Quassia amara</i> ,	Simaroubaceae	Planta inteira e raízes	Levemente
<i>Simaba cedron</i>		Planta inteira e sementes	Parcial
<i>Capsicum frutescens</i>	Solanaceae	Frutos maduros	Levemente
<i>Solanum allophyllum</i> ,		Folhas, ramos e caule	Levemente
<i>Solanum nudum</i>		Folhas, ramos e caule	Ausente
<i>Aegiphila panamensis</i>	Verbenaceae	Folhas, ramos e caule	Parcial
<i>Renealmia alpinia</i>	Zingiberaceae	Rizomas	Parcial

3.5. *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae)

Connarus favosus Planch. (Figura 2), conhecida popularmente como “Verônica”, pertence à família Connaraceae, a qual é representada, no Brasil, por aproximadamente 72 espécies distribuídas em cinco gêneros: *Bernardinia* sp. Planch., *Cnestidium* sp. Planch., *Connarus* sp. Planch., *Pseudoconnarus* sp. Radlk. e *Rourea* sp. Aubl. Estudos com espécies do gênero *Connarus* sp. avaliaram o potencial depressor do sistema nervoso central, antidiarreico, analgésico, antifúngico, antiofídico, anti-inflamatório, antipirético, anti-hipertensivo, antibacteriano, antiedematogênico, anti-hemorrágico, entre outras atividades (SRITHI et al., 2009; PARACAMPO, 2011; MOURA et al., 2013; CORREIA-DA-COSTA et al., 2014; MOURA et al., 2015).

A *Connarus favosus* é endêmica do Brasil, ocorrendo nos estados do Amazonas, Pará, Ceará, Maranhão e Mato Grosso (FORERO, 1983). O extrato aquoso das entrecascas dessa espécie já foi testado anteriormente frente às atividades hemorrágica, edematogênica, coagulante e fosfolipásica A₂ induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*, seguindo protocolo de pré-incubação, e os resultados mostraram que houve inibição de 100% das atividades edematogênica, coagulante e fosfolipásica. A redução dos halos hemorrágicos em $73,32 \pm 7,1\%$ e $94,45 \pm 1,6\%$, para as concentrações de 1:5 e 1:10, respectivamente (MOURA et al., 2013). O potencial anti-hemorrágico de *C. favosus* foi verificado para o veneno de *Bothrops jararaca*, seguindo protocolo de pré-incubação, e houve redução de 100% da hemorragia (MOURA et al., 2015).

Em nosso estudo o extrato aquoso das cascas de *Connarus favosus* foi avaliado frente atividade hemorrágica, do veneno de *Bothrops atrox*, por três diferentes protocolos experimentais: pré-tratamento, pós-tratamento e tratamento coadjuvante. O preparo do chá (decoção), as doses e a via de administração (oral) foram às mesmas utilizadas pela população. No pré-tratamento os animais receberam o extrato uma hora antes da injeção de veneno, pois alguns moradores das comunidades bebem o chá antes de irem para a mata, como prevenção. No pós-tratamento os animais receberam o veneno e, em seguida, a dose do extrato por via oral. Os animais do tratamento coadjuvante receberam

o soro antibotrópico pela via endovenosa, o extrato pela via oral logo após a injeção do veneno. Os resultados mostraram que houve inibição da hemorragia pelos três tipos de protocolos testados e que essa espécie vegetal poderá ser utilizada para o tratamento de picadas por serpentes, após os experimentos preconizados pela ANVISA (Silva et al., 2015 – submetido JEP-D-15-03311). Os resultados são promissores para a *Connarus favosus* visto que foram originados de testes in vivo que simulavam o uso tradicional, pois a maioria das espécies vegetais consideradas anti-hemorrágicas, na literatura, foi testada em ensaios que utilizam a metodologia de pré-incubação, como exposto no tópico anterior desta revisão, sobre espécies vegetais com ação anti-hemorrágica contra veneno de serpentes *Bothrops atrox* (Tabela 2).

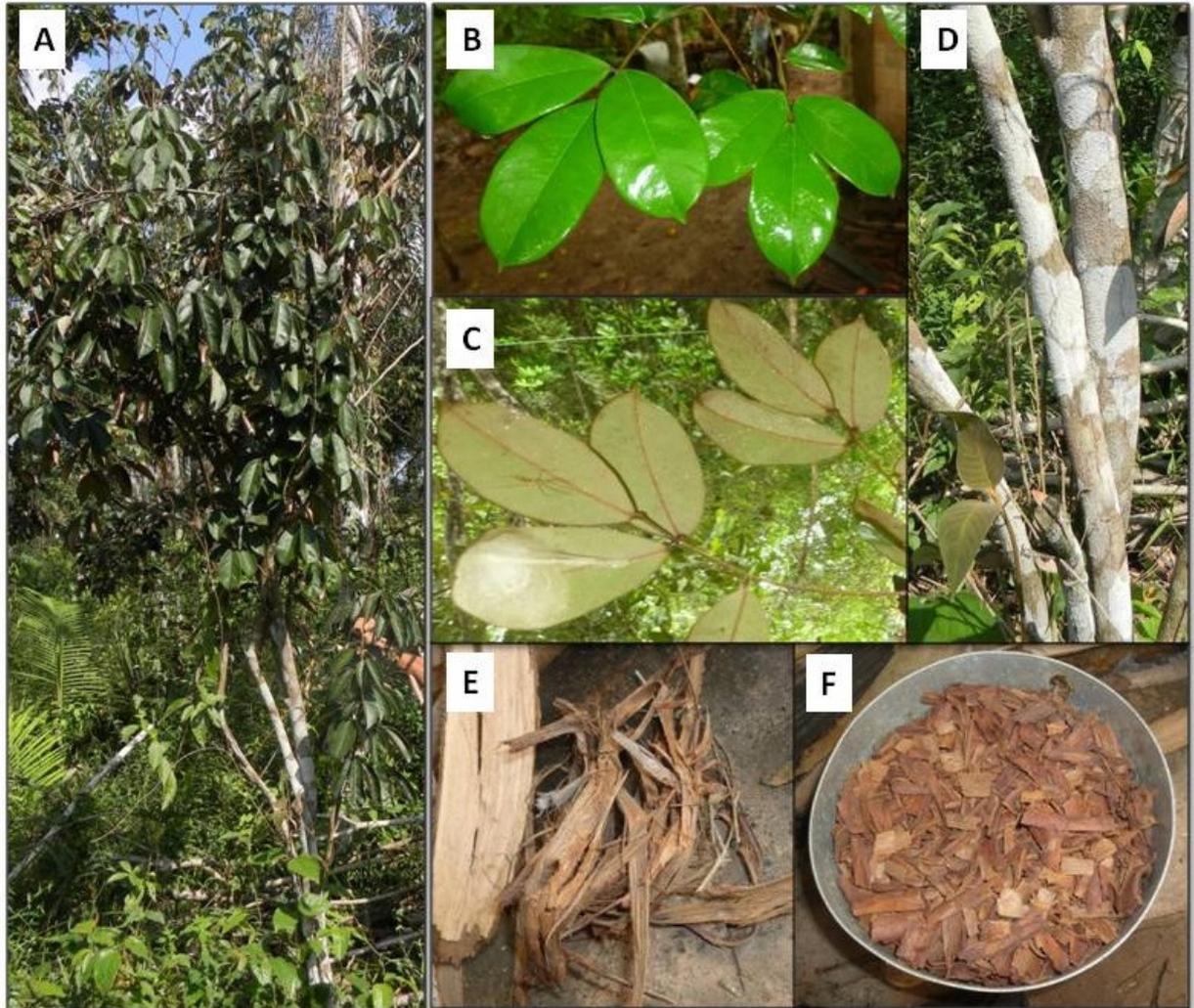


Figura 2 - Aspecto geral de *Connarus favosus* Planch. A) Arbusto; B) Folhas (visão adaxial); C) Folhas (visão abaxial); D) Tronco; E) Secagem das cascas (temperatura ambiente); F) Cascas secas para trituração. Fotos: Thaís Pereira da Silva

Os grupos de metabólitos secundários encontrados no extrato de *Connarus favosus* por ensaio de prospecção fitoquímica foram auronas, catequinas, chalconas, flavonas, flavonóis, leucoantocianidinas, fenóis, esteroides e taninos, o que coincide com os resultados encontrados por MOURA e colaboradores (2013; 2015), onde foi detectada presença das classes fenóis e taninos, além de cumarinas. Estes compostos fenólicos podem interagir com as proteínas do veneno que apresentem íons em suas composições, formando grandes complexos, como MORS e colaboradores (2000) relataram anteriormente, que muitos componentes químicos contidos nos extratos vegetais como alcaloides, taninos, flavonoides, triterpenos, ligninas tem a capacidade de inibir o veneno de serpentes, ou interagindo com as macromoléculas ou quelando íons importantes para suas atividades enzimáticas. Apesar dessas evidências, as plantas antiofídicas têm sido estudadas, na maioria das vezes, por ensaios de pré-incubação, veneno como os extratos, aplicados em animais experimentais e os resultados

obtidos podem superestimar a atividade antiofídica de algumas das espécies estudadas por tal método (MORS et al., 2000).

4. Conclusão

Nesta revisão foram abordados os acidentes ofídicos na Região Norte, fatores epidemiológicos e as espécies de serpentes envolvidas no ofidismo, evidenciando que *Bothrops atrox* é a espécie responsável pela maior parte dos acidentes nessa região do país. A hemorragia é o sintoma mais grave do envenenamento botrópico e os danos locais como abscessos, necrose e Síndrome Compartmental podem ser permanentes e irreversíveis. O levantamento das plantas com potencial antiofídico frente à atividade hemorrágica do veneno das serpentes da espécie *Bothrops atrox* revelou que a maioria é testada pelo protocolo de pré-incubação resultando muitas vezes na inibição total da atividade, o que difere dos resultados quando os extratos vegetais são testados pela via de uso tradicional.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da Bolsa de Produtividade (No. 303786/2013-2) à Doutora Maria Cristina dos Santos e Bolsa de Mestrado concedida à Thaís Pereira da Silva. Os autores também gostariam de agradecer ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTOX) pelo suporte financeiro (ref. nº 573790/2008-6/CNPq, 1217/2011/CAPES).

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

- ASSAFIM, M.; CORIOLANO, E. C.; BENEDITO, S. E.; FERNANDES, C. P.; LOBO, J. F. R.; SANCHEZ, E. F.; ROCHA, L. M.; FULY, A. L. **Hypericum brasiliense plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom.** Journal of Venom Research, v. 2, p. 11-16, 2011.
- BADILLA-BALTODANO, B.; CHAVES-MORA, F.; JIMÉNEZ-CASTRO, S.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, G.; POVEDA-ALVAREZ, L. J. **Effects of an extract of *Cissampelos pareira* on the hemorrhagic and proteolytic activities from *Bothrops asper* venom.** Pharmacognosy Magazine, v. 4, n. 13, p. 27-30, 2008.
- BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. **Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis.** PLoS Negl Trop Dis, v. 4, n. 6, p. 0000727, 2010.
- BERNARDE, P. S. **Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica.** Gazeta Médica da Bahia, v. 81, n. 1, p. 55-63, Jan-Jun 2011.
- BERNARDE, P. S.; GOMES, J. D. O. **Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil.** Acta Amazonica, v. 42, p. 65-72, 2012.
- BIONDO, R.; PEREIRA, A. M. S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. **Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract.** Biochimie, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, 2003.

BITTENCOURT, J. A. H. M.; OLIVEIRA, N. K. S.; CABRAL, M. S.; RIBEIRO, J. R.; HENRIQUES, S. V. C.; SANTOS PIKANÇO, L. C.; SANTOS, C. B.; STIEN, D.; CARVALHO, J. C. T.; SILVA, J. O. **Antiophidian activity of *Brosimum guianense* (Aubl) Huber**. American Journal of Pharmacology and Toxicology, v. 9, n. 2, p. 148, 2014.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. **Proteolytic specificity and cobalt exchange of hemorrhagic toxin e, a zinc protease isolated from the venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*)**. Biochemistry, v. 22, n. 16, p. 3770-8, 1983.

BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; MACHADO, C. **A profile of snake bites in Brazil, 2001 to 2012**. Journal of Clinical Toxicology, v. 4, n. 3, p. 1-7, 2014.

BORGES, C. C.; SADAHIRO, M.; DOS-SANTOS, M. C. **Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 32, n. 6, p. 637-646, 1999.

BORGES, M. H.; ALVES, D. L. F.; RASLAN, D. S.; PILÓ-VELOSO, D.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; LIMA, M. E. **Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms**. Journal of Ethnopharmacology, v. 98, n. 1-2, p. 21-29, 2005.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. **Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)**. Toxicon, v. 39, n. 12, p. 1863-1869, 2001.

BUSTILLO, S.; GARCÍA-DENEGRI, M. E.; GAY, C.; VAN DE VELDE, A. C.; ACOSTA, O.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LEIVA, L. **Phospholipase A2 enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis**. Chemico-biological interactions, v. 240, p. 30-36, 2015.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H. V.; FURTADO, M. F. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. **Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management**. Journal of Proteomics, v. 74, n. 4, p. 510-527, 2011.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.; BRODIE, E. D. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. 1. ed. New York: Comstock Publishing Associates Ithaca, 2004. 1032

CARDOSO, D. F.; YAMAGUCHI, I. K.; MOURA-DA-SILVA, A. M. **Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular**. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009a. cap. 38, p.419-431.

CARDOSO, J. L. C. **A fitoterapia antiveneno na medicina brasileira**. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 42, p.481-485.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Servier, 2009b.

CASTRO, O.; GUTIÉRREZ, J. M.; BARRIOS, M.; CASTRO, I.; ROMERO, M.; UMAÑA, E. **Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales**. Revista de Biología Tropical, v. 47, p. 605-616, 1999.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. **Snake venom variability: methods of study, results and interpretation.** *Toxicon*, v. 29, n. 11, p. 1279-303, 1991.

CORREIA-DA-COSTA, R.; SANTANA, D. B.; ARAÚJO, R. M.; PAULA, J. E.; NASCIMENTO, P. C.; LOPES, N. P.; BRAZ-FILHO, R.; ESPINDOLA, L. S. **Discovery of the rapanone and suberonone mixture as a motif for leishmanicidal and antifungal applications.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 1, p. 135-140, 2014.

DA-SILVA, A. M.; BERNARDE, P. S.; ABREU, L. C. **Accidents with poisonous animals in Brazil by age and sex.** *Journal of Human Growth and Development*, v. 25, n. 1, p. 54-62, 2015.

DA-SILVA, J. O.; COPPEDE, J. S.; FERNANDES, V. C.; SANT'ANA, C. D.; TICLI, F. K.; MAZZI, M. V.; GIGLIO, J. R.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. **Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra maculoba*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 145-152, 2005.

DA-SILVA, J. O.; FERNANDES, R. S.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, C. Z.; MAZZI, M. V.; FRANCO, J. J.; GIULIATTI, S.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. **Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra maculoba*.** *Toxicon*, v. 50, n. 2, p. 283-291, 2007.

DA-SILVA, M. L.; MARCUSSI, S.; FERNANDES, R. S.; PEREIRA, P. S.; JANUARIO, A. H.; FRANCA, S. C.; DA-SILVA, S. L.; SOARES, A. M.; LOURENÇO, M. V. **Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*.** *Pharmaceutical Biology*, v. 50, n. 3, p. 366-375, 2012.

DOS-SANTOS, M. C. **Serpentes peçonhentas e ofidismo no Amazonas.** In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 11, p.132-142.

DOS-SANTOS, M. C.; MARTINS, M.; BOECHAT, A. L.; SÁ-NETO, R. P.; OLIVEIRA, M. E. **Serpentes de interesse médico da Amazônia.** Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 1995. 72

ESMERALDINO, L. E.; SOUZA, A. M.; SAMPAIO, S. V. **Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin.** *Phytomedicine*, v. 12, n. 8, p. 570-576, 2005.

FEITOSA, E. L.; SAMPAIO, V. S.; SALINAS, J. L.; QUEIROZ, A. M.; SILVA, I. M.; GOMES, A. A.; SACHETT, J.; SIQUEIRA, A. M.; FERREIRA, L. C. L.; DOS-SANTOS, M. C. **Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: a case-control study.** *PLoS one*, v. 10, n. 7, p. e0132237, 2015.

FÉLIX-SILVA, J.; SOUZA, T.; MENEZES, Y. A. S.; CABRAL, B.; CÂMARA, R. B. G.; SILVA-JUNIOR, A. A.; ROCHA, H. A. O.; REBECCHI, I. M. M.; ZUCOLOTTI, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. **Aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jararaca* snake venom.** *PLoS one*, v. 9, n. 8, p. e104952, 2014.

FERNANDES, F. F. A.; TOMAZ, M. A.; EL-KIK, C. Z.; MONTEIRO-MACHADO, M.; STRAUCH, M. A.; CONS, B. L.; TAVARES-HENRIQUES, M. S.; CINTRA, A. C. O.; FACUNDO, V. A.; MELO, P. A. **Counteraction of *Bothrops* snake venoms by *Combretum leprosum* root extract and arjunolic acid.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 155, n. 1, p. 552-562, 2014.

FERNANDES, R. S.; COSTA, T. R.; MARCUSSI, S.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; RODRIGUÉZ, G. I.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. **Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic**

extract and its fractions. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2011.

FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; ANDREONI, A. A. S.; VITAL, G. R. F.; CAMPOS, M. M. C.; HABERMEHL, G. G.; MORAES, V. L. G. **Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae).** Toxicon, v. 30, n. 10, p. 1211-1218, 1992.

FORERO, E. **Connaraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.**, Rio de Janeiro, 1983. Disponível em: < <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16929> >. Acesso em: 07.10.2015.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. **Acidente botrópico.** In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 6, p.81-95.

FURTADO, M. F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. **Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring.** Toxicon, v. 29, n. 2, p. 219-226, 1991/01/01 1991.

GÓMEZ-BETANCUR, I.; BENJUMEA, D.; PATIÑO, A.; JIMÉNEZ, N.; OSORIO, E. **Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavanone isolated from *Renealmia alpinia* (Rottb.) MAAS.** Journal of Ethnopharmacology, v. 155, n. 1872-7573 (Electronic), p. 1609–1615, 2014.

GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. **An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica.** Toxicon, v. 26, n. 4, p. 411-413, 1988.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. **Efectos locales en el envenenamiento ofídico em América Latina.** In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 33, p.352-375.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. **Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage.** Biochimie, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, 2000.

IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. **Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae).** Biochimie, v. 85, n. 7, p. 669-675, 2003.

JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. L. R.; SATO, D. N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. **Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties.** Chemico-biological interactions, v. 150, n. 3, p. 243-251, 2004.

JORGE, M. T.; MENDONÇA, J. S.; RIBEIRO, L. A.; SILVA, M. L. R.; KUSANO, E. J. U.; CORDEIRO, C. L. D.-S. **Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 32, p. 6-10, 1990.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; SILVA, H. J. **The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths.** PLoS Medicine, v. 5, n. 11, p. 218, 2008.

MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A. F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. **Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata***. Journal of Ethnopharmacology, v. 102, n. 3, p. 364-370, 2005.

MELGAREJO, A. R. **Serpentes peçonhentas do Brasil**. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 4, p.42-70.

MELO, M. M.; LÚCIA, M.; HABERMEHL, G. G. **Plant extracts for topic therapy of *Bothrops alternatus* envenomation**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 1, p. 29-34, 2007.

MELO, P. A.; NASCIMENTO, M. C.; MORS, W. B.; SUAREZ, K. G. **Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents**. Toxicon, v. 32, n. 5, p. 595-603, 1994.

MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; VALE, L. H.; ALCANTARA, T. M.; IZIDORO, L. F.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. **Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract**. Phytother Res, v. 22, n. 7, p. 859-866, 2008.

MENDES, M. M.; VIEIRA, S. A. P. B.; R., G. M. S.; PAULA, V. F.; ALCANTARA, T. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; DOS-SANTOS, J. I.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; RODRIGUES, V. M. **Triacontyl *p*-coumarate: an inhibitor of snake venom metalloproteinases**. Phytochemistry, v. 86, n. 1873-3700 (Electronic), p. 72-82, 2013.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. **Plant natural products active against snake bite - the molecular approach**. Phytochemistry, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

MOURA, V. M.; BEZERRA, A. N. S.; MOURÃO, R. H. V.; LAMEIRAS, J. L. V.; RAPOSO, J. D. A.; SOUSA, R. L.; BOECHAT, A. L.; OLIVEIRA, R. B.; CHALKIDIS, H. M.; DOS-SANTOS, M. C. **A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods**. Toxicon, v. 85, n. 0, p. 59-68, 2014.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A. F.; DOS-SANTOS, M. C.; RAPOSO, J. D. A.; LIMA, A. E.; OLIVEIRA, R. C.; SILVA, M. N.; MOURÃO, R. H. V. **Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: an assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom**. Journal of Ethnopharmacology., v. Artigo submetido em outubro de 2014, 2015.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A. F.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, A. M. M.; CHALKIDIS, H. M.; SILVA, M. N.; PACHECO, S.; MOURA, R. H. V. **Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts**. Journal of Medicinal Plants Research, v. 7, n. 31, p. 2330-2337, 2013.

MOURÃO, V. B.; GIRALDI, G. M.; NEVES, L. M. G.; GASPI, F. O. G.; RODRIGUES, R. A. F.; ALVES, A. A.; ESQUISATTO, M. A. M.; MAZZI, M. V.; MENDONÇA, F. A. S.; SANTOS, G. M. T. **Anti-hemorrhagic effect of hydro-alcoholic extract of the leaves of *Mikania glomerata* in lesions induced by *Bothrops jararaca* venom in rats**. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 29, n. 1, p. 30-37, 2014.

NASCIMENTO, S. P. **Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos no Estado de Roraima, Brasil, entre 1992 e 1998**. Cadernos de Saúde Pública, v. 16, n. 1, p. 271-276, 2000.

NISHIJIMA, C. M.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A.; LOPES-FERREIRA, M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom**. Molecules, v. 14, n. 3, p. 1072-1080, 2009.

OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. **Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms.** Journal of Ethnopharmacology, v. 98, n. 1–2, p. 213-216, 2005.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; BEATRIZ MESA, M. A.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; LUIS ARANGO, J.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; MARÍA RODRÍGUEZ, L.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; MARIANO GÓMEZ, L.; LUIS URIBE, F.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A. **Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital.** Toxicon, v. 40, n. 8, p. 1107-1114, 2002.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. **Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom.** Journal of Ethnopharmacology, v. 73, n. 1-2, p. 233-241, 2000.

PARACAMPO, N. E. N. P. ***Conarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk. (Connaraceae): tradicionalmente utilizada como barbatimão no Pará.** 1. ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2011.

PARDAL, P. P. O.; SOUZA, S. M.; MONTEIRO, M. R. C. C.; WEN, F. H.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; TOMY, S. C.; SANO-MARTINS, I. S.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; COLOMBINI, M.; KODERA, N. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; VELARDE, D. T.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. **Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil.** Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 98, n. 1, p. 28-42, January 1, 2004 2004.

PATIÑO, A. C.; LÓPEZ, J.; ARISTIZÁBAL, M.; QUINTANA, J. C. **Evaluation of the inhibitory effect of extracts from leaves of *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) on the venom of *Bothrops asper* (mapaná).** Biomédica, v. 32, n. 3, p. 365-374, 2012.

SILVA, T. P.; MOURA, V. M.; SOUZA, M. C. S.; SANTOS, V. N. C.; SILVA, K. A. M. M.; MENDES, M. G. G.; NUNEZ, C. V.; ALMEIDA, P. D. O.; LIMA, E. S.; MOURÃO, R. H. V.; DOS-SANTOS, M. C. **Antioxidant and antimicrobial activities of *Conarus favosus* Planch. and its role in blocking the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom when administered by the same route as in folk medicine.** Journal of Ethnopharmacology, submetido JEP-D-15-03311, 2015.

SOUZA, L. F.; NICOLAU, C. A.; PEIXOTO, P. S.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PORTES-JUNIOR, J. A.; MOURÃO, R. H. V.; LIMA-DOS-SANTOS, I.; SANO-MARTINS, I. S.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. **Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 9, p. e2442, 2013.

SRITHI, K.; BALSLEV, H.; WANGPAKAPATTANAWONG, P.; SRISANGA, P.; TRISONTHI, C. **Medicinal plant knowledge and its erosion among the Mien (Yao) in northern Thailand.** Journal of Ethnopharmacology, v. 123, n. 2, p. 335-342, 2009.

STRAUCH, M. A.; TOMAZ, M. A.; MONTEIRO-MACHADO, M.; RICARDO, H. D.; CONS, B. L.; FERNANDES, F. F. A.; EL-KIK, C. Z.; AZEVEDO, M. S.; MELO, P. A. **Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents.** Journal of Ethnopharmacology, v. 145, n. 1, p. 50-58, 2013.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. **Inflammation induced by *Bothrops asper* venom.** Toxicon, v. 54, n. 1, p. 67-76, 2009.

TORRES, A. M.; CAMARGO, F. J.; RICCIARDI, G. A.; RICCIARDI, A. I.; DELLACASSA, E. **Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom.** Natural Product Communications, v. 6, n. 9, p. 1393-1396, 2011a.

TORRES, M. C. M.; DAS-CHAGAS, F. C. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; JORGE, R. J. B.; XIMENES, R. M.; MONTEIRO, H. S. A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; DIZ-FILHO, E. B. S.; TOYAMA, M. H. **Antiophidic solanidane steroidal alkaloids from *Solanum campaniforme*.** Journal of Natural Products, v. 74, n. 10, p. 2168-2173, 2011b.

VALE, L. H. F.; MENDES, M. M.; FERNANDES, R. S.; COSTA, T. R.; S. HAGE-MELIM, L. I.; SOUSA, M. A.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FRANCA, S. C.; SILVA, C. H. T. P.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. **Protective effect of *Schizolobium parahyba* flavonoids against snake venoms and isolated toxins.** Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 11, n. 20, p. 2566-2577, 2011.

VALE, L. H. F.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. **Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions.** Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, v. 103, n. 1, p. 104-107, 2008.

VILAR, J. C.; CARVALHO, C. M.; FURTADO, M. F. D. **Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas.** Biologia Geral e Experimental, v. 6, n. 1, p. 1-36, 2005.

WALDEZ, F.; VOGT, R. C. **Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil.** Acta Amazonica, v. 39, n. 3, p. 681-696, 2009.

WARRELL, D. A. **The global problem of snake bite: its prevention and treatment.** In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; TAM, C. K. (Ed.). Recent Advances in Toxinology Research. Singapore: Venom & Toxin Research Group, National University of Singapore, v.2, 1992. p.121-153.

WEN, F. H.; MONTEIRO, W. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; TAMBOURGI, D. V.; MENDONÇA-DA-SILVA, I.; SAMPAIO, V. S.; DOS-SANTOS, M. C.; SACHETT, J.; FERREIRA, L. C. L.; KALIL, J.; LACERDA, M. **Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon: Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 9, n. 5, p. e0003701, 2015.

CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO À REVISTA
Journal of Ethnopharmacology (ISSN: 0378.8741)
E-MAIL DE CONFIRMAÇÃO (ANEXO II)

Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Connarus favosus* Planch. e seu papel em bloquear a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox*, quando administrada pela mesma via do uso tradicional.

Thaís Pereira da Silva^a; Valéria Mourão de Moura^a; Maria Carolina Scheffer de Souza^{a,c}; Vanessa Neves Carvalho Santos^c; Kissinara A. M. Moreira da Silva^c; Mara Giselle Guimarães Mendes^c; Cecília Verônica Nunez^c; Patrícia Danielle Oliveira de Almeida^d; Emerson Silva Lima^d; Rosa Helena Veras Mourão^b, Maria Cristina Dos-Santos^{a*}

^a*Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil*

^b*Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA, Brasil.*

^c*Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia - LABB, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus, AM, Brasil.*

^d*Laboratório de Atividade Biológica – Biophar, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, AM, Brasil.*

*Autor correspondente. Tel.: +554191332676. E-mail address: thaiscwb@yahoo.com.br. Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas - Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Japiim, Manaus, Amazonas, Brasil, CEP 69057-000.

Resumo

Relevância etnofarmacológica: A espécie vegetal *Connarus favosus* é utilizada no tratamento de acidentes ofídicos pelas populações tradicionais e por comunidades ribeirinhas do Oeste do Pará, Brasil. Entretanto, são poucos os estudos que avaliam o potencial antiofídico de plantas medicinais pelo método semelhante ao uso tradicional. **Objetivo do estudo:** O estudo investigou o potencial antiofídico do extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) frente às atividades hemorrágica e fosfolipásica A₂ induzida pela peçonha da serpente *Bothrops atrox* (PBa). Também foram avaliados os potenciais antioxidantes e antimicrobianos desse extrato. **Materiais e métodos:** A presença de classes de metabólitos secundários foi verificada pela prospecção fitoquímica do EACf e as concentrações de compostos fenólicos (taninos condensados e taninos hidrolisáveis) foram determinadas por ensaios colorimétricos. A ação antioxidante foi avaliada por ensaios quantitativos de 2,2-difenil-1-picril- hidrazila (DPPH) e Fe³⁺/Fenantrolina. A ação antimicrobiana foi avaliada pelas metodologias de difusão em disco e da concentração mínima inibitória. Foram utilizadas bactérias que normalmente estão presentes na cavidade oral de serpentes, como a *Escherichia coli*, ou na pele de indivíduos acidentados, como a *Staphylococcus aureus*, além de outras nove bactérias gram-positivas ou gram-negativas. A citotoxicidade do EACf foi avaliada utilizando linhagem de fibroblasto humano MRC-5. A atividade hemorrágica foi avaliada in vivo, (v.o.), seguindo protocolos de pré-tratamento, pós-tratamento e ação coadjuvante do EACf com o soro antibotrópico (SAB). A hemólise indireta causada pela fosfolipase A₂ (PLA₂) foi testada in vitro incorporando EACf ao gel de agarose. A interação entre EACf e PBa foram avaliadas por eletroforese SDS-PAGE, Western Blot (Wb) e Zimografia. **Resultados:** O perfil fitoquímico identificou dez classes de metabólitos secundários no EACf e valores expressivos de fenóis totais e taninos (condensados e hidrolisáveis) foram indicados por ensaio colorimétrico. O EACf possui alto potencial antioxidante e também antimicrobiano, inibindo o crescimento de oito das onze bactérias testadas. O efeito citotóxico de EACf foi de IC₅₀ = 51,91 (46,86 - 57,50). A atividade hemorrágica do PBa foi inibida de forma significativa em 21,6% e 48,6% para a dose de 62,49 mg/kg de AECf, seguindo os protocolos de pré e pós-tratamento, respectivamente. A dose de 124,98 mg/kg inibiu 66,3% da atividade, no protocolo de pós-tratamento, e a dose de 20,83 mg/kg inibiu 34,3% da hemorragia, no protocolo de ação coadjuvante com o SAB. A inibição da PLA₂ foi significativa

para as doses de 62,49 e 124,98 mg/kg. O SDS-PAGE e Wb mostraram que a mistura do PBa com o EACf expôs as mesmas bandas encontradas com alta intensidade no veneno isolado, porém de forma muito reduzida. Na zimografia, houve ação proteolítica do PBa, mas quando o veneno foi pré-incubado com o EACf houve bloqueio dessa atividade. **Conclusão:** O extrato aquoso de *Connarus favosus* foi eficaz no bloqueio da atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops atrox* quando administrado nas doses e via tradicionalmente utilizadas. Além disso, apresentou potencial antibacteriano e antioxidante podendo, após estudos adicionais, ser usado no tratamento complementar nas ações locais e infecções secundárias, frequentes nos acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* sp.

Palavras-chave: *Connarus favosus*, *Bothrops atrox*, plantas antiofídicas, picadas de serpentes, medicina popular.

1. Introdução

Os envenenamentos causados por ofídicos são considerados pela Organização Mundial da Saúde (WHO), desde 2009, doença tropical negligenciada e se configuram como sério problema de saúde pública (WHO, 2009). Isso se confirma no Brasil onde foram notificados, pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), cerca de vinte e oito mil acidentes por ano, no período de 2009 a 2013. Os moradores da região Norte do Brasil foram os que sofreram o maior número de acidentes, no período de 2001 a 2012 (Bochner et al., 2014). A faixa etária mais acometida foi entre 20 e 39 anos e foi verificado que letalidade aumenta com o avanço da idade da vítima (Da Silva et al., 2015; Feitosa et al., 2015).

Na região Amazônica, apesar de existirem várias serpentes peçonhentas, a maioria dos acidentes é atribuída para espécie *Bothrops atrox*, popularmente conhecida como jararaca-do-norte, jararaca-do-rabo-branco, surucucurana ou jipoboia (Dos-Santos, 2009; Waldez and Vogt, 2009). As peçonhas das espécies do gênero *Bothrops* sp. são compostas por uma mistura de proteínas com ou sem atividade enzimática como fosfolipases A₂ e metaloproteinases, além de outros componentes orgânicos, que provocam grave dano tecidual local, caracterizado por edema, bolhas, hemorragia e necrose do músculo esquelético. Estes efeitos locais se estendem rapidamente após a picada e o atraso no acesso ao atendimento médico pode resultar em dano tecidual permanente (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Gutiérrez et al., 2006). Dentre as complicações dos efeitos locais destaca-se a Síndrome Compartimental causada pela compressão do feixe vaso-nervoso decorrente do edema, produzindo isquemia no membro afetado causando dor intensa, parestesia, diminuição da temperatura do segmento distal, cianose e déficit motor (Ministério da Saúde do Brasil, 2001). A necrose associada à isquemia local é resultado da lesão vascular, da infecção secundária, trombose arterial, síndrome compartimental ou do uso indevido de torniquetes ou, ainda, de tratamentos alternativos, sem comprovação científica (Ministério da Saúde do Brasil, 2001). Os efeitos sistêmicos são causados principalmente pelas ações coagulante e hemorrágica em regiões vitais, que podem induzir o choque ou a insuficiência renal aguda. Alguns casos de óbitos foram relacionados com hemorragia digestiva e do sistema nervoso central (França and Málaque, 2009).

Para o acidente ofídico o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil é a administração de antiveneno. No caso de acidentes botrópicos os efeitos tóxicos sistêmicos são normalmente neutralizados após a administração do soro antibotrópico, o que não ocorre de forma eficaz com os constituintes do veneno indutores de danos locais (Cardoso, 2009). A Organização Mundial da Saúde adicionou, em 2010, o soro antiofídico na Lista de Remédios Essenciais para os países onde há grande ocorrência de acidentes com serpentes, entretanto, o tratamento não está sempre disponível nas áreas mais remotas o que dificulta o seu alcance, principalmente na Região Amazônica onde o principal meio de transporte é o fluvial (Borges et al., 1999; Dos-Santos, 2009; Wen, 2009). Nessa região os municípios apresentam grandes dimensões geográficas e poucas Unidades de Saúde o que dificulta ainda mais o acesso ao tratamento preconizado, acarretando em maiores agravos aos pacientes (Borges et al., 1999; Dos-Santos, 2009; Feitosa et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que as populações tradicionais utilizam diversas plantas, que acreditam ter ação antiofídica, seja como coadjuvantes à soroterapia ou como medicamento alternativo quando não há disponibilidade do antiveneno (Mors et al., 2000; Otero et al., 2000; Cardoso, 2009; Moura et al., 2015). Destas, muitas possuem identificação taxonômica correta, porém muitas nunca foram validadas conforme seu uso tradicional, pelo fato de serem mencionadas somente pelos seus nomes populares, o que pode variar entre localidades, dificultando o avanço dos estudos científicos (Moura and Mourão, 2012; Moura et al., 2015).

Dentre essas espécies de plantas utilizadas estão aquelas pertencentes ao gênero *Connarus* sp., conhecidos popularmente por suas atividades antiofídica, anti-inflamatória, antipirética, antibacteriana, antiedematogênica, anti-hemorrágica, entre outras (Paracampo, 2011; Moura et al., 2013; Moura et al., 2015). *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae) é uma espécie endêmica e possui distribuição geográfica nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Na Região Norte a espécie pode ser encontrada nos Estados do Amazonas e Pará (Forero, 1983). A entrecasca do tronco de *C. favosus* é comumente utilizada pela população tradicional para tratamento dos acidentados por serpentes peçonhentas na forma de tintura ou decocção (Moura et al., 2013; Moura et al., 2015).

A eficácia do extrato aquoso de *Connarus favosus* no bloqueio das atividades hemorrágica, coagulante, fosfolipásica e edematogênica induzidas pelos venenos de

Bothrops atrox e *Bothrops jararaca* foram comprovadas em trabalhos anteriores, seguindo protocolo de pré-incubação (Moura et al., 2013; Moura et al., 2015). Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antiofídico da espécie vegetal *Conarus favosus* frente à atividade hemorrágica, induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, utilizando os protocolos de pré-tratamento, pós-tratamento e de ação coadjuvante com o soro antiofídico de acordo com o preparo tradicional do extrato aquoso, a via de administração (oral) e as doses utilizadas pela população. Atividades *in vitro* como fosfolipásica, antimicrobiana, antioxidante e toxicidade também foram avaliadas.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção da peçonha de *Bothrops atrox* (PBa) e soro antiofídico (SAB)

Os procedimentos de coleta das serpentes e extração da peçonha foram aprovados pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob o código de autorização nº 14018. A peçonha de *Bothrops atrox* foi extraída de espécimes adultos coletados na Floresta Nacional do Tapajós, localizada no Km 83 da BR-163, Santarém, PA, Brasil. Após coleta, a peçonha foi liofilizada no Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará e preservada a -20 °C até o momento do uso. O soro antiofídico produzido pelo Instituto Butantan (lote número 105113B) foi obtido do plasma de cavalos imunizados com peçonhas de cinco espécies de serpentes, sendo estas: *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops neuwiedi* (12,5%), *Bothrops moojeni* (12,5%), *Bothrops jararacussu* (12,5%) e *Bothrops alternatus* (12,5%).

2.2. Animais

Camundongos Swiss de ambos os sexos e com dois meses de idade, provenientes do Biotério do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, da Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará foram usados em todos os experimentos *in vivo*. Os animais foram mantidos em gaiolas-padrão, com água e ração disponíveis *ad libitum*, sob temperatura de 22 ± 1 °C, em ciclo de iluminação 12:12 (12 horas claro e 12 horas escuro). Os experimentos foram realizados de acordo com os critérios da Lei Federal 11.794. O projeto foi aprovado pela Comissão

de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual do Pará, em 17 de outubro de 2011, sob o parecer 43/11 (Anexo II).

2.3. Material vegetal

2.3.1. Coleta e identificação

Exemplares de *Connarus favosus* foram coletados na Comunidade de São Pedro, Santarém - PA (Brasil, 02°32'08,9" S e 54°54'23,9" W). O ponto de coleta foi marcado pelo Sistema Global de Medição de Posição (GPS - GARMIN Map 60csx). A espécie vegetal foi identificada pela Botânica Doutora Regina Célia Viana Martins da Silva e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Embrapa Amazônia Oriental/Belém sob o código (IAN): 185216.

2.3.2. Obtenção do extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) e doses, conforme uso tradicional.

Obtenção do extrato aquoso: Amostras de casca de *Connarus favosus*, após serem desidratadas em temperatura ambiente, foram trituradas em moinho e 30 g do pó das cascas foram diluídos em 450 mL de água destilada para o preparo do chá conforme uso tradicional, resultando na concentração de 66,666 mg/mL. A solução foi agitada a 100°C, até próximo da fervura. Em seguida a solução foi coada, filtrada em papel filtro, liofilizada e conservada em frasco âmbar em temperatura ambiente.

Obtenção da dose: Conforme uso tradicional (Anexo III), para a realização dos testes, uma alíquota contendo 150 mL- que é a quantidade equivalente a um copo de chá, utilizado por um indivíduo adulto de 60 kg- foi liofilizada. O peso seco final da alíquota foi de 1,25 g/copo de 150 mL e, portanto, 1,25 g/ 60kg ou 20,83 mg/kg. Essa dose foi usada como base para os cálculos das doses administradas por animal.

2.3.3. Determinação das classes de constituintes químicos do extrato

A prospecção de constituintes químicos presentes no extrato aquoso de *Connarus favosus*, na concentração de 5 mg/mL, seguiu a metodologia descrita por Matos (1997). Investigou-se qualitativamente a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: alcaloides, antocianidinas, antocianinas, catequinas, esteroides, fenóis, flavonas, flavonóis, flavononas, flavanonóis, leucoantocianidinas, saponinas, taninos, triterpenoides e xantonas.

2.3.4. Ensaio colorimétricos

Os doseamentos de fenóis totais e taninos totais seguiram as metodologias de (Mole and Waterman, 1987a; Mole and Waterman, 1987b). Os taninos foram quantificados pela formação do complexo com albumina bovina sérica, sendo separados dos demais compostos fenólicos por centrifugação (Jacobson et al., 2005). A absorvância dos fenóis totais e taninos totais foram medidos em comprimento de onda de 510nm, em espectrofotômetro Quimis Q -108U2VL. Ácido tânico (Sigma) foi utilizado no preparo das curvas padrão. A curva padrão de ácido tânico para a leitura dos fenóis totais foi apresentada nas concentrações de 0,05, 0,2, 0,3, 0,5 e 0,8 mg/mL. Para a curva padrão de leitura dos taninos totais, as concentrações foram de 0,3, 0,5 e 0,8 mg/mL. O doseamento de taninos hidrolisáveis seguiu o método de iodato de potássio (Willis and Allen, 1998). Para taninos hidrolisáveis, a absorvância é medida em comprimento de onda de 550nm, em espectrofotômetro Quimis Q -108U2VL. Ácido tânico (Sigma) foi utilizado no preparo da curva padrão e as concentrações foram de 0,05, 0,2, 0,3, 0,5 e 0,8 mg/mL. O doseamento de taninos condensados ou proantocianidinas, presentes em cascas de plantas, foi realizado conforme descrito por Sun et al. (1998), com modificações. A absorvância foi medida em comprimento de onda de 490 a 510nm, em espectrofotômetro Quimis Q -108U2VL. A catequina hidratada (Sigma) foi utilizada no preparo da curva padrão dos taninos condensados nas concentrações de 0,1 a 0,8 mg/mL.

2.4. Ação antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Connarus favosus*, na concentração de 5 mg/mL, foi realizada utilizando os ensaios quantitativos com 2,2-difenil-1-picril- hidrazila (DPPH) e com Fe^{3+} /Fenantrolina. Para o DPPH foram adicionados 990 μ L da solução de DPPH e 10 μ L da solução do extrato aquoso, após 30 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 517 nm. Para o ensaio utilizando Fe^{3+} , 10 μ L de uma solução padrão de Fe^{3+} e 10 μ L do EACf foram acrescentados a 980 μ L de fenantrolina. A leitura foi realizada após 1 hora em espectrofotômetro, em 508 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão e os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5. Ação antimicrobiana

2.5.1. Difusão em disco

A ação antimicrobiana do extrato aquoso de *Connarus favosus* foi testada seguindo a metodologia descrita por Hu et al. (2004), com modificações. Placas de ágar Mueller-Hinton foram inoculadas com as bactérias teste, nas quais foram perfurados poços de 6 mm de diâmetro e inoculados 50 µL do extrato, na concentração de 5 mg/mL. As placas foram mantidas em estufa por 24h e o diâmetro dos halos de inibição foi estimado com auxílio de paquímetro digital. As bactérias utilizadas no teste foram *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Edwardsiella tarda* ATCC 15974, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Nocardia brasiliensis* ATCC 19296, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Salmonella enteridis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e *Serratia marcescens* ATCC 13880. Todas as cepas foram adquiridas na Fundação André Tosello, Campinas, Brasil. Considerando o diâmetro dos halos de inibição, a atividade do extrato foi classificada como: baixa atividade (até 0,6 cm), média atividade (até 1,3 cm) e alta atividade (maior que 1,3 cm). O ensaio foi realizado em triplicata e o controle utilizado foi o antibiótico oxitetraciclina (125 µg/mL).

2.5.2. Teste de concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima do extrato aquoso de *Connarus favosus* foi testada seguindo a metodologia descrita por Eloff (1998), com modificações. O extrato foi testado quanto ao potencial inibidor do crescimento das bactérias *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Nocardia brasiliensis* ATCC 19296 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 mg/mL. Todas as cepas foram adquiridas na Fundação André Tosello, Campinas, Brasil. O antibiótico oxitetraciclina (125 µg/mL) foi utilizado como controle positivo e o ágar Mueller-Hinton, apenas com bactérias, foi utilizado como controle negativo. As leituras da absorbância, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm, foram realizadas antes das placas serem levadas à estufa por 24 horas e após este período de tempo. A atividade inibitória foi obtida pelas diferenças das densidades ópticas entre essas duas leituras.

2.6. Teste de toxicidade celular

A citotoxicidade do extrato foi avaliada pelo método de Alamar Blue, segundo Nakayama et al. (1997). O ensaio de Alamar Blue (resazurina) é um ensaio colorimétrico que envolve a redução da resazurina a resorufina. Neste estudo foi utilizada a linhagem de fibroblastos humanos MRC-5 cultivados em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen), a 37 °C, em estufa a 5% de CO₂. As células foram plaqueadas na concentração de 5 x 10³ células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as placas foram tratadas com o EACf nas concentrações de 7,812; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL, durante período de 72 horas. Após a incubação, uma solução de Alamar Blue (10 µl de Alamar Blue 0.4 % em PBS) foi adicionado e as células foram incubadas durante 2 horas a 37 °C. Após o tempo de metabolização da resazurina padronizada foi realizada a leitura da fluorescência. O sinal de fluorescência foi monitorado utilizando um leitor multiplacas em comprimento de onda de 590 nm de excitação e 530-560 nm de emissão. O sinal fluorescente gerado a partir do ensaio foi proporcional ao número de células vivas na amostra. Como controle positivo de morte, foi avaliada a citotoxicidade da doxorubicina (25 µg/mL) e controle negativo dimetilsulfóxido 0.1% (DMSO). O ensaio foi realizado em triplicata.

2.7. Teste de inibição da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

A Dose Mínima Hemorrágica (DMH) é definida como a menor quantidade de peçonha necessária para induzir um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro, em camundongos. Para determinação de atividade hemorrágica foi utilizado o protocolo modificado de Kondo et al. (1960) e a DMH obtida deste pool do veneno de *Bothrops atrox* foi de 5µg (Moura et al., 2014). Para a avaliação do bloqueio da atividade hemorrágica foram avaliados três tratamentos:

Pós-tratamento: três grupos de camundongos (n=4/grupo) foram utilizados para avaliar as diferentes doses EACf: 20,83, 62,49 e 124,98 mg/kg que foram administradas por via oral (v.o.), imediatamente após a injeção de 10 µg veneno (2DMH), via intradérmica (i.d.), na região do dorso. O grupo controle positivo (n=3) recebeu o veneno via i.d. e água v.o.; o grupo controle negativo (n=2) recebeu salina

(50 µL, i.d.), no dorso e salina pelo plexo venoso oftálmico (100 µL), e o grupo controle-padrão (n=4) recebeu o veneno (i.d) e soro antibotrópico (SAB) via plexo venoso oftálmico (100 µL).

Pré-tratamento: dois grupos teste (n=4/grupo) receberam, por via oral, o EACf nas doses de 20,83 ou 62,49 mg/kg e uma hora após os animais foram injetados, intradermicamente, com 2DMH do veneno. O grupo controle positivo (n=3) recebeu água (v.o.) e o veneno (i.d); o grupo controle negativo (n=3) salina pelo plexo venoso oftálmico e salina (i.d.), e o grupo controle-padrão (n=3) recebeu o soro antibotrópico, via plexo venoso oftálmico e o veneno id.

PBa/EACf coadjuvante: dois grupos de animais (n=4/grupo) foram injetados com veneno e imediatamente após receberam EACf, via oral, nas doses de 20,83 ou 62,49 mg/kg e SAB via plexo venoso oftálmico. O grupo controle positivo (n=3) recebeu 2DMH do veneno, água v.o. e salina pelo plexo venoso oftálmico; o grupo controle negativo (n=3) recebeu salina i.d., água v.o e salina pelo plexo venoso oftálmico, e o grupo controle-padrão (n=3) recebeu o veneno (i.d) e o soro antibotrópico via plexo venoso oftálmico.

Após uma hora a injeção do veneno, os animais foram sacrificados e os tecidos dorsais foram removidos para avaliação dos halos hemorrágicos por digitalização (Scanner HP Deskjet F4280) e medição com auxílio de script do software MatLab (Gonzalez et al., 2009; Guerra et al., 2011).

2.8. Inibição da atividade fosfolipásica

A avaliação da atividade hemolítica indireta foi mensurada pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂). Esta foi medida pelo método de Gutiérrez et al. (1988) em placa de 1% de gel de agarose contendo gema de ovo (gema de ovo:salina, 1:3) como uma fonte de lecitina, e eritrócitos para revelar hemólise. Gutiérrez et al. (1988) definiram que a Dose Mínima Hemolítica indireta (DMHi) é a quantidade de veneno capaz de produzir um halo hemolítico de 10 mm, este método foi utilizado no presente trabalho, com modificações (Moura et al., 2014). O potencial do EACf em inibir a atividade fosfolipásica A₂ do veneno de *Bothrops atrox* foi avaliado pelo seguinte protocolo: EACf foi incorporado ao gel nas doses de 20,83, 62,49 ou 124,98 mg/kg. O SAB foi incorporado ao gel da placa (padrão-ouro). Uma placa contendo somente o gel de agarose foi utilizada como controle-positivo do veneno. Aos orifícios feitos nas placas foram adicionados o veneno (2DMHi) e salina 0,9% em um

ponto de cada placa para controle. A atividade enzimática foi expressa como percentual de inibição, onde 100% de inibição corresponderam à ausência do halo hemolítico. Cada ensaio foi realizado em triplicata e expresso como média \pm desvio padrão da média.

2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western Blot

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970), foi realizado para verificar a interação entre as proteínas do veneno de *Bothrops atrox* e o EACf. Os géis de corrida utilizados foram na concentração de 15% e o de empacotamento em 5%. Nesta etapa, duas alíquotas de veneno de *Bothrops atrox* com EACf (1:5) e amostras de veneno e EACf isoladas foram pré incubadas por 30 minutos a 37°C. Após, uma das duas alíquotas da mistura de veneno de *Bothrops atrox* com EACf foi centrifugada a 1300 rpm por 5 minutos, o precipitado e sobrenadante foram separados e analisados sob condições não redutoras. Para a revelação das bandas proteicas de um dos géis foi utilizado corante Coomassie Brilhante Blue (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). O outro gel foi utilizado no Western blot e as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 μ m (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), no sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-RD), sob corrente constante de 200 mA, durante 3 horas, sob refrigeração. Logo após a transferência, a membrana foi imersa em solução bloqueadora (TBS contendo 5% de leite em pó desnatado Molico-Nestlé-SP), a 4 °C, durante o período da noite. No dia seguinte, a membrana foi lavada com salina 0,9% por três vezes e adicionada a uma solução contendo soro antibotrópico na diluição de 1:1000 no tampão de TBS por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida a membrana foi lavada com salina 0,9%, por cinco vezes e adicionado o conjugado anti-IgG de cavalo marcado com a peroxidase, produzido em coelhos (Sigma-Aldrich, Israel), na diluição de 1:1000, em TBS, por 45 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação. Após lavagem, a membrana foi imersa em solução reveladora. A revelação se deu com a adição da solução cromógena (Diaminobenzidina-DAB) 5mg/10mL, em presença do substrato da peroxidase, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30%. A reação foi interrompida, após 5 minutos, por sucessivas lavagens com água destilada e a membrana foi secada entre folhas de papel de filtro.

2.10. Zimografia/atividade proteolítica

A análise da presença de enzimas proteolíticas contidas no veneno de *Bothrops atrox* e EACf sobre a gelatina foi realizada de acordo com metodologia descrita por Monteiro-dos-Santos et al. (2011). Para tal, o SDS-PAGE foi preparado seguindo a metodologia citada anteriormente com adição de 2mg/mL de gelatina (Sigma) incorporada ao gel. Ao final da corrida, o gel foi lavado com tampão contendo Tris-HCl 50 mM, Cloreto de Cálcio 5 mM e Triton X-100 2,5%, durante 20 minutos, duas vezes. Após a lavagem, o gel foi imerso em tampão de incubação (Tris- HCl 50 mM, cloreto de cálcio 5 mM, Triton X-100 2,5% e azida sódica 0,02%) a 37^o C, durante 16 horas. Após esse período, o gel ficou em tampão de lavagem por 20 minutos, duas vezes, e foi corado com solução corante (Coomassie-Blue, Bio-Rad, R-250, CA, USA), por 16 horas e deixado em solução descorante overnight. O resultado final mostrou bandas de atividade proteolíticas claras, contrastando com o fundo azul, efeito da digestão do substrato presente na matriz poliacrilamida-gelatina.

2.11. Análise Estatística

Os valores foram expressos como média e desvio padrão da média das amostras. As comparações entre as médias do teste de ação antimicrobiana difusão em disco foram realizadas por teste *t*. As comparações entre os grupos dos testes de citotoxicidade, concentração mínima inibitória, inibição da atividade hemorrágica e fosfolipásica foram realizadas pela análise de variância ANOVA (One-Way) e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1 Classes de metabólitos secundários

Na Tabela 1 estão expressas as classes de metabólitos secundários que foram detectadas no extrato aquoso de *Connarus favosus*.

Table 1. Teste fitoquímico qualitativo para detecção de metabólitos secundários no extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf).

Classes de metabólitos secundários	EACf
Alcaloides	-
Antocianidinas	-
Antocianinas	-
Auronas	+
Catequinas	+
Chalconas	+
Esteroides	+
Fenóis	+
Flavanonas	-
Flavanonols	-
Flavonas	+
Flavonóis	+
Leucoantocianidinas	+
Quinonaa	-
Saponines	-
Taninos	+
Triterpenoides	-
Xantonas	+

(-): ausência; (+): presença.

3.2. Ensaio colorimétrico

Fenóis totais, taninos totais, taninos hidrolisáveis e taninos condensados foram quantificados e suas concentrações estão expressas na Tabela 2.

Tabela 2. Fenóis totais, taninos totais, taninos hidrolisáveis e taninos condensados contidos no extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf).

Amostras	Fenóis totais	Taninos totais	Taninos hidrolizáveis	Taninos condensados
EACf	25,83 ± 0,45	24,40 ± 2,90	27,16 ± 2,95	28,51 ± 3,16

Resultados expressos em g por 100 g de extrato liofilizado. Média ± desvio padrão ($n = 3$)

3.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) está demonstrada na Tabela 3. O EACf possui valores equivalentes de 1,2 para o método DPPH e 1,7 para o método Fe^{3+} , em relação ao padrão do ácido ascórbico, o que demonstra alto potencial antioxidante.

Tabela 3. Atividade antioxidante testada com o extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf 5 mg/mL), determinado pelos testes com DPPH e Fe³⁺. Ácido ascórbico [AA] foi usado como antioxidante equivalente. Valores em equivalência para *Connarus favosus* (Equiv.) 0-1,0: potencial mais alto que [AA]; 1,0-2,0: potencial alto; 2,0-4,0: potencial mediano.

Amostra	DPPH		Fe ³⁺	
	[AA] eq	Equiv.	[AA] eq	Equiv.
EACf	4,0 ± 0,3	1,2 ± 0,1	2,8 ± 0,5	1,7 ± 0,3

Média ± desvio padrão (n = 3)

3.4. Atividade antimicrobiana

3.4.1. Difusão em Disco

A atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Connarus favosus* está demonstrada na Tabela 4. O teste por difusão em disco indicou que o extrato possui efeito inibitório sobre o crescimento de oito bactérias. Entretanto, alta atividade inibitória foi apresentada apenas pelo extrato aquoso quando testado frente ao *Bacillus cereus*, os demais resultados demonstraram média ou baixa atividade inibitória em relação ao crescimento das bactérias. Não foi detectada inibição do crescimento de *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*.

Tabela 4. Teste de difusão em disco do extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf 5 mg/mL) em *Bacillus cereus* (BC), *Corynebacterium glutamicum* (CG), *Escherichia coli* (EC), *Edwardsiella tarda* (ET), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Nocardia brasiliensis* (NB), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Pseudomonas fluorescens* (PF), *Salmonella enteridis* (SE), *Staphylococcus aureus* (SA) e *Serratia marcescens* (SM). Valores até 0,6 cm: baixa atividade; 1,3 cm: atividade mediana; acima de 1,5 cm: alta atividade.

Amostras	BC	CG	EC	ET	KP	NB	PA	PF	SE	SA	SM
EACf	1,5 ^b	1,0 ^b	0,8 ^b	-	0,7 ^b	0,8 ^a	-	-	0,8 ^b	1,0 ^b	0,8 ^a
Oxitetraciclina	3,5 ^a	2,5 ^a	2,3 ^a	-	1,6 ^a	0,7 ^a	-	-	1,8 ^a	2,9 ^a	0,8 ^a

a, b: Na mesma coluna, valores representados por letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0,05$ verificado pelo Teste t não pareado.

(*): Crescimento bacteriano foi reduzido, mas não totalmente inibido; (-): Não houve inibição; Zonas de inibição em cm.

3.4.2. Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima, das diferentes concentrações de extrato de *Connarus favosus*, avaliada sobre as bactérias *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Nocardia brasiliensis*, *Staphylococcus aureus* é apresentada na Figura 1. A concentração mínima de extrato capaz de inibir o crescimento de *Bacillus cereus* foi de 3 mg/mL, visto que as doses menores são estatisticamente diferentes do controle positivo, representado pelo antibiótico oxitetraciclina, indicando que não

houve inibição significativa. Para *Corynebacterium glutamicum*, não houve inibição significativa do crescimento com as concentrações do extrato. Entretanto, o extrato inibiu o crescimento de *Nocardia brasiliensis* em todas as concentrações testadas. A inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* foi significativa nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/mL. A Tabela 5 expõe, em porcentagem, os valores de inibição dos crescimentos das bactérias pelas diferentes concentrações do extrato aquoso de *C. favosus* e controle positivo, a oxitetraciclina (125 µg/mL).

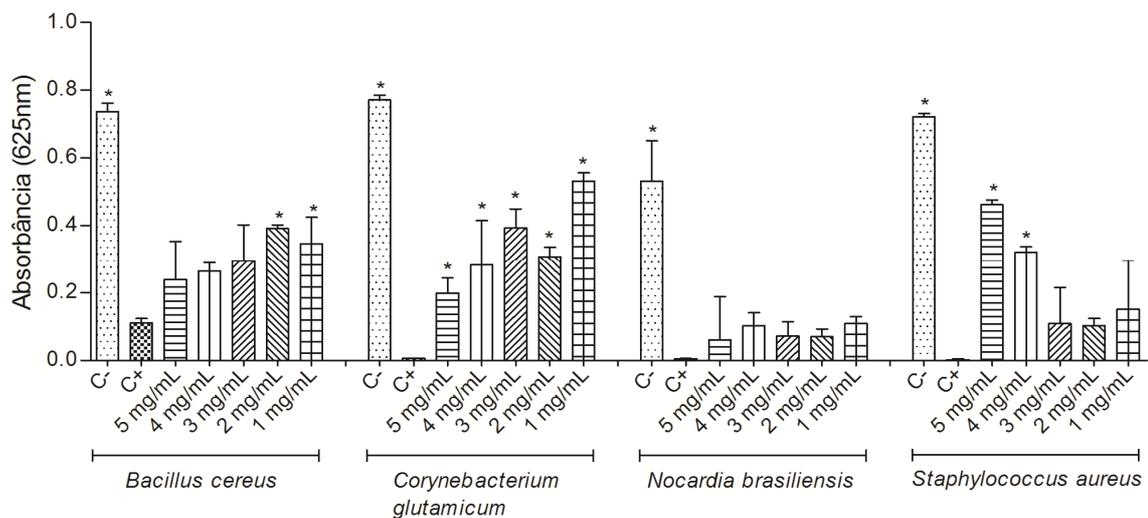


Figura 1. Valores de concentração inibitória mínima determinados por ensaio colorimétrico pelo extrato aquoso de *Connarus favosus* (1-5 mg/mL) em *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Nocardia brasiliensis* e *Staphylococcus aureus*. C-: Controle negativo = crescimento bacteriano; C+: Controle positivo = bactéria + oxitetraciclina (125 µg/mL). (*) Indica diferença significativa entre o extrato aquoso de *C. favosus*, em todas as concentrações e C- relacionados com C+ a $p < 0.05$, verificado pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Inibição do crescimento bacteriano por diferentes concentrações do extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) em *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Nocardia brasiliensis* e *Staphylococcus aureus*. Oxitetraciclina (125 µg/mL) foi usado como controle antibiótico. Valores em %.

Bactéria	Oxitetraciclina 125 µg/mL	EACf (mg/mL)				
		1	2	3	4	5
<i>Bacillus cereus</i>	85	52,8	46,8	60,1	64,1	67,6
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	99,2	31	60,1	49	63,4	74,1
<i>Nocardia brasiliensis</i>	98,9	79,6	87	86,5	80,7	88,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	99,7	79,1	85,8	84,9	55,6	36

3.5. Toxicidade celular

Na figura 2 está expresso o resultado do efeito tóxico do extrato aquoso de *Conarus favosus* em células não tumorais (fibroblastos da linhagem MCR5). O controle positivo para a toxicidade, a doxorrubicina, se mostrou significativamente diferente de todas as concentrações testadas do extrato, exceto para a concentração de 250µg/mL.

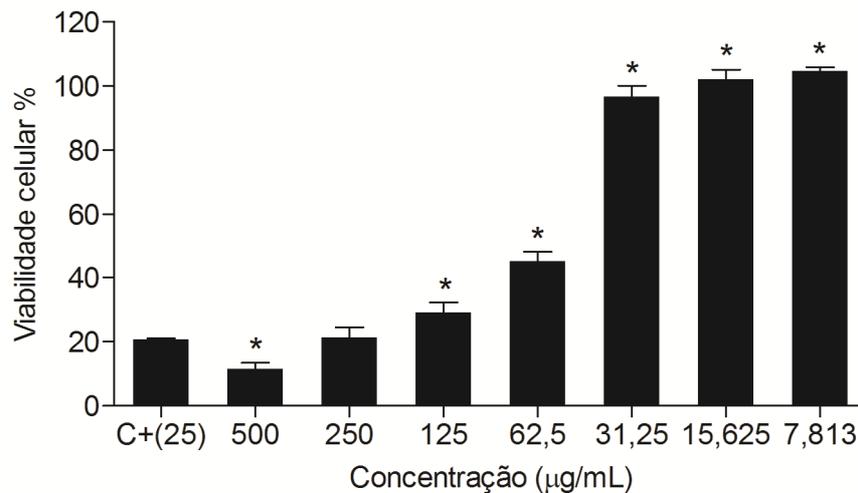


Figura 2. Efeito citotóxico causado pelo extrato aquoso de *Conarus favosus*, em diferentes concentrações, em células de fibroblasto humano MRC-5. Doxorrubicina (25 µg/mL) foi usado como controle positivo (C+) para a citotoxicidade. IC₅₀ = 51,91 (46,86 - 57,50). (*): Indica diferença significativa entre controle e extrato a $p < 0.05$ verificado pelo teste de Tukey.

3.6. Inibição da atividade hemorrágica

A inibição da atividade hemorrágica está exibida nas Figuras 3 e 4. Seguindo os protocolos de pré-tratamento e pós-tratamento, a hemorragia induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* foi bloqueada pelo extrato aquoso de *Conarus favosus*. A redução dos halos hemorrágicos no pré-tratamento foi de 2,8% para a dose de 20,83 mg/kg e 21,6% para a dose de 62,49 mg/kg. As inibições dos halos no pós-tratamento, para as doses de 20,83, 62,49 e 124,98 mg/kg, foram de 16,9%, 48,6% e 66,3%, respectivamente. Entretanto, a redução não foi significativa para a dose de 20,83 mg/kg, em relação ao controle do veneno, no pré-tratamento e pós-tratamento. Para o protocolo de ação coadjuvante do extrato administrado com o soro antibotrópico, a redução dos halos foi de 34,3% para a dose de 20,83 mg/kg e 26,6% para a dose de 62,49 mg/kg. No protocolo de ação coadjuvante não houve redução significativa da atividade hemorrágica para a dose de 62,49 mg/kg.

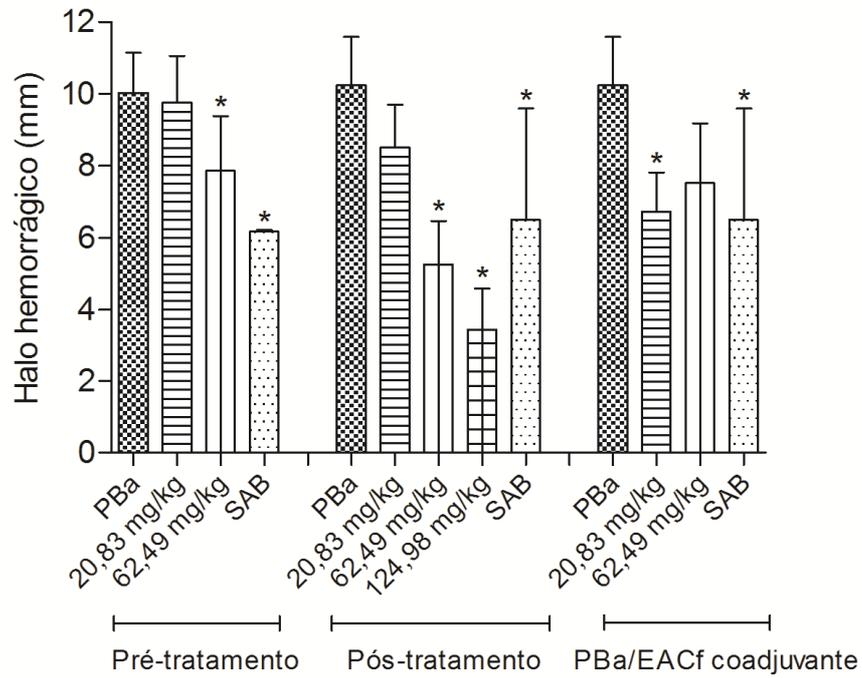


Figura 3. Inibição da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* (PBa) pelo extrato aquoso de *Conarus favosus* utilizando diferentes tratamentos. (*): Indica diferença significativa entre controle (PBa) e as doses de extrato ou soro antiofídico (SAB) a $p < 0.05$ verificado pelo teste de Tukey.

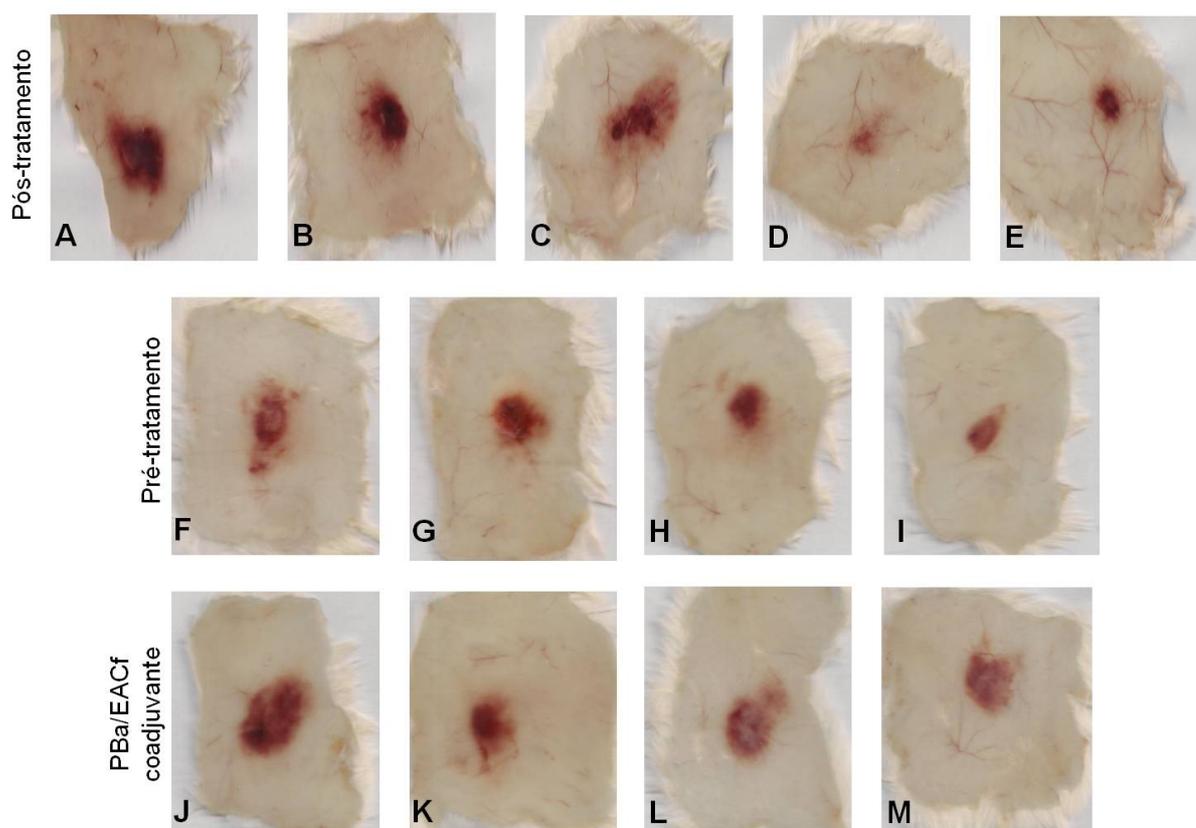


Figura 4. Peles de animais após teste de inibição dos halos hemorrágicos induzidos pela peçonha de *Bothrops atrox* (PBa), em diferentes tratamentos com extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) e soro antibotrópico (SAB). Pós-tratamento: (A) PBa + salina, (B) PBa + 20,83 mg/kg de EACf, (C) PBa + 62,49 mg/kg de EACf, (D) PBa + 124,98 mg/kg de EACf, (E) PBa + BA; Pré-tratamento: (F) PBa + salina, (G) 20,83 mg/kg de EACf + PBa, (H) 62,49 mg/kg de EACf + PBa, (I) SAB + PBa; PBa/EACf coadjuvante: (J), PBa + salina, (K) PBa + 20,83 mg/kg de EACf + SAB, (L) PBa + 62,49 mg/kg de EACf + SAB, (M) PBa + SAB.

3.7. Inibição da atividade fosfolipásica

A inibição da atividade fosfolipásica A_2 está demonstrada na Figura 5. Os resultados apontaram que houve inibição significativa da hemólise induzida pela ação indireta do veneno de *Bothrops atrox* para as doses de 62,49 e 124,98 mg/kg de extrato aquoso de *Connarus favosus* incorporadas ao gel, bloqueando a atividade fosfolipásica A_2 em 4,19% e 27,15%, respectivamente. Quando o soro antibotrópico (BA) foi incorporado ao gel, a hemólise causada pela peçonha (PBa) foi reduzida em 46,55% (Anexo V).

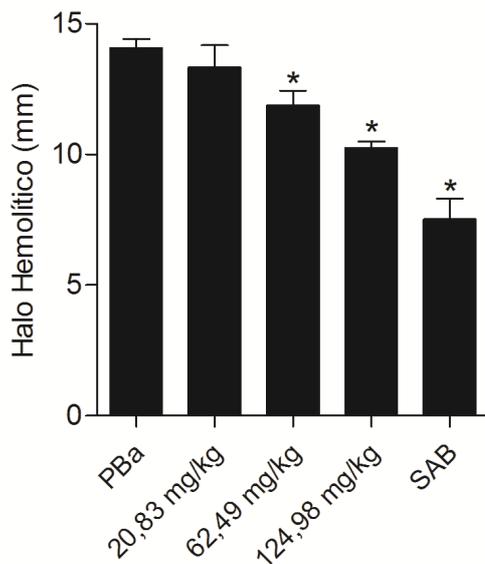


Figura 5. Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops atrox* (PBa) por diferentes doses do extrato aquoso de *Connarus favosus* ou soro antivenomático, incorporado ao gel. Peçonha de *Bothrops atrox* (PBa) foi usada como controle positivo. (*): Indica diferença significativa entre as doses do extrato ou soro antivenomático (SAB) em relação ao controle (PBa) a $p < 0.05$ verificado pelo teste de Tukey.

3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western Blot

A Figura 6 expressa os perfis das proteínas presentes na peçonha (PBa) e proteínas das interações entre PBa e AECf. No SDS-PAGE, o veneno de *Bothrops atrox* apresentou três bandas proteicas fracas de alta massa molecular, acima de 113 kDa, bandas de massa molecular, entre 46,6 e 72 kDa, e três bandas de massa molecular abaixo de 17,4 kDa. As bandas com massa próxima de 46,6 kDa e duas bandas com massa abaixo de 17,4 kDa se mostraram mais intensas. Os perfis do pellet e sobrenadante obtidos pela mistura do veneno com extrato exibiram as bandas proteicas de 46,6, kDa e as duas bandas com massa abaixo de 17,4 kDa. A mistura de veneno com extrato apresentou essas mesmas bandas, mas com menor intensidade. No Western Blot, os anticorpos do antivenomático interagiram com maior intensidade com as bandas de média e alta massa molecular do veneno e do pellet. As proteínas de alta e média massa molecular presentes na mistura do PBa com AECf foram detectadas com pouca intensidade. O extrato isolado não apresentou interação com os anticorpos.

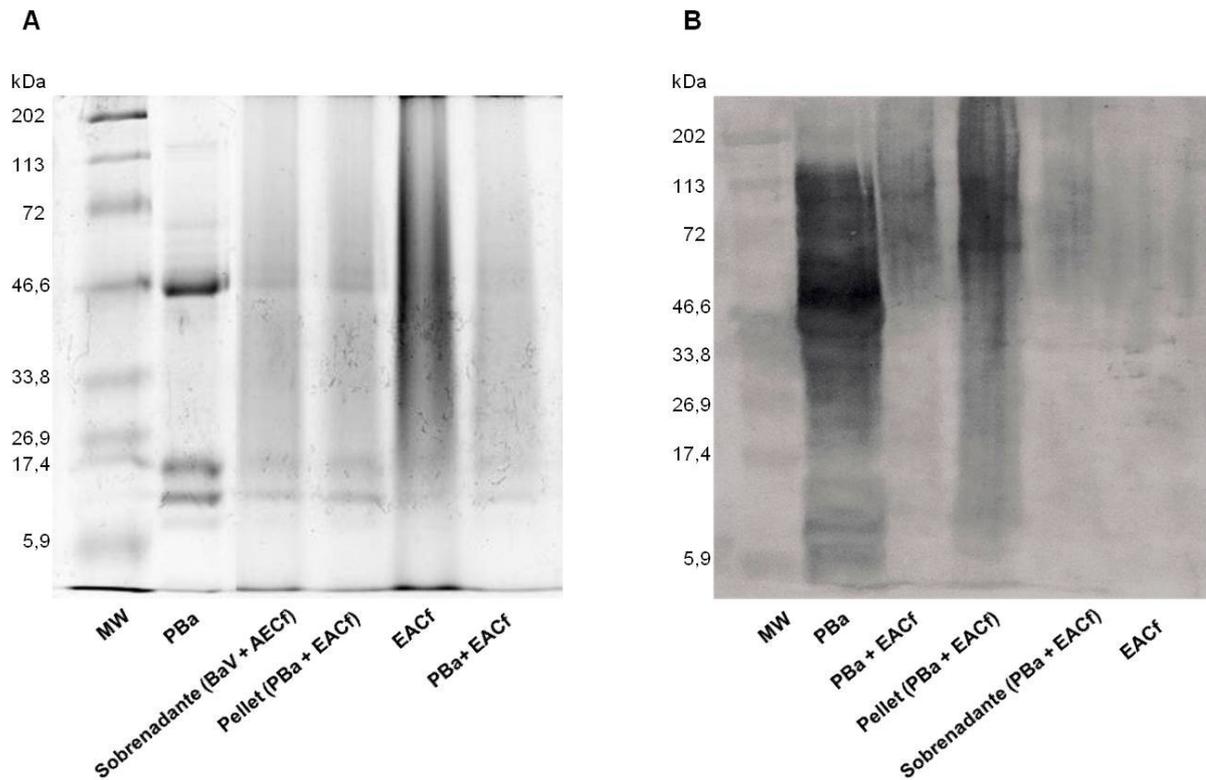


Figura 6. Interação entre o extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) e peçonha de *Bothrops atrox* (PBa 15 μ L). A mistura contendo PBa e EACf (1:5) foi centrifugada e ambos pellet e sobrenadante foram verificados por (A) eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE-15%) e (B) Western blot (15%).

3.9. Zimografia

As atividades proteolíticas do veneno de *Bothrops atrox*, extrato aquoso de *Connarus favosus* e da interação de ambos estão expressas na Figura 7. O veneno apresentou duas bandas com atividade gelatinolítica. A primeira banda possui massa molecular próxima de 113 kDa e a segunda banda massa entre 46,6 e 72 kDa. A interação entre o veneno e extrato (PBa + AECf) mostrou que houve um bloqueio da atividade enzimática e o extrato isolado (AECf) não apresentou atividade gelatinolítica.

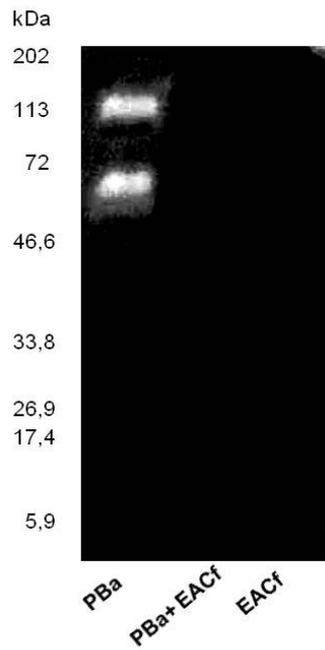


Figura 7. Zimografia mostrando a atividade proteolítica do veneno de *Bothrops atrox* (PBa 15µL), Extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) e a interação entre ambos (PBa + EACf 1:5). Bandas claras indicam a presença de enzimas com atividade gelatinolítica na peçonha de *B. atrox*.

4. Discussão

As entrecascas da espécie *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae) é utilizada na forma de tintura ou decocção pelas comunidades tradicionais, residentes no entorno de Santarém, Pará, Brasil, como uma opção da medicina popular para tratamento de acidentes com serpentes. Em trabalhos anteriores, essa espécie já foi avaliada quanto ao potencial antiofídico seguindo protocolos de pré-incubação do veneno com o extrato aquoso (Moura et al., 2013; Moura et al., 2015). Neste presente trabalho foi verificada a atividade antiofídica do extrato aquoso de *C. favosus* conforme o uso tradicional utilizando a via de administração e doses indicadas pela população consultada (Moura et al., 2015).

Os acidentes ofídicos que ocorrem com mais frequência na região Norte do Brasil são atribuídos para espécie *Bothrops atrox* e seu veneno é composto principalmente por metaloproteinases (SVMP – 54,6%), L-aminoiácido oxidase (LAO – 14,2%), lectina-like do tipo C (CLECL – 11,8%), serinaproteases (SVSP – 8,1%), fosfolipases (PLA₂ – 3,3%) e demais proteínas (8,0%), responsáveis pelas diferentes atividades biológicas induzidas por esse veneno (Sousa et al., 2013).

A inflamação induzida pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp. leva a liberação de mediadores inflamatórios, a expressão de moléculas de adesão celular, recrutamento de células, dentre outros eventos. As células como monócitos (macrófago) e neutrófilos recrutados para o local, exercem a suas funções fagocíticas liberando espécies reativas de oxigênio, que podem potencializar o dano causado pelo veneno (Teixeira et al., 2009), visto que as defesas antioxidantes são comprometidas pelo estresse oxidativo, após picada de serpentes do gênero *Bothrops* sp. (Cardoso et al., 2009). Em estudo realizado, com pacientes hospitalizados, após sofrerem picadas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu*, foi detectado decréscimo de aproximadamente 50% nos níveis plasmáticos de vitamina E, em relação ao grupo controle, possivelmente devido ao aumento endógeno de H₂O₂ e outras espécies reativas de oxigênio, acarretando em estresse oxidativo (Strapazzon et al., 2015). O extrato aquoso de *Connarus favosus* apresentou alto potencial antioxidante quando submetido a dois ensaios quantitativos, DPPH e Fe³⁺. Os compostos fenólicos presentes nesse extrato podem atuar sequestrando radicais livres ou quelando metais e, assim, prevenindo a oxidação lipídica, atuando tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do

processo oxidativo (Sousa et al., 2007). Entretanto, a alta toxicidade apresentada por esses compostos fenólicos dificulta seu uso terapêutico (Soares, 2002). O uso de suplementação antioxidante pode ser recomendada a fim de atenuar os danos causados pelas picadas de serpentes do gênero *Bothrops* sp., contudo, testes de toxicidade aguda e biodisponibilidade, em condições fisiológicas, devem ser realizados com o extrato aquoso de *Conarus favosus* para avaliar os riscos deste tratamento. No presente estudo foi verificada apenas a citotoxicidade in vitro, a qual indicou que o controle positivo, a doxorrubicina, foi significativamente mais tóxico do que todas as concentrações testadas do extrato, exceto para a de 250 µg/mL. Os resultados demonstram que é preciso dez vezes a concentração do extrato aquoso de *C. favosus* para causar a mesma taxa de mortalidade celular que a doxorrubicina, na concentração de 25 µg/mL. No entanto, será necessária a realização de outros testes, visto que este preliminar não considera os sistemas orgânicos, como absorções metabólicas intestinais e hepáticas.

Acidentes com serpentes ocasionam infecção secundária ou por bactérias presentes na cavidade oral da serpente ou na microbiota presentes em todas as camadas da pele da vítima, tanto em lesões superficiais quanto nas mais profundas (Otero et al., 2002; Grice et al., 2008). Tais infecções provocam celulite, abscessos locais e até septicemia, exigindo a utilização de antibióticos como agente terapêutico, nesses acidentes por animais peçonhentos. A formação de abscessos resultantes de infecções locais é um fator de risco para amputação de membros de pacientes que sofreram picadas de serpentes. A ligação das bactérias aos fatores de solubilidade tecidual, como consequência da ação de componentes do veneno, pode dificultar o reconhecimento das bactérias pelos mecanismos imunológicos (Gutiérrez and Lomonte, 2009). Amostras de abscessos de 99 pacientes que foram picados por serpentes do gênero *Bothrops* sp. foram submetidas ao teste de difusão em disco para detecção de bactérias gram-positivas e gram-negativas. As bactérias encontradas foram *Morganella morganii* em 44,4% das culturas, *Escherichia coli* em 20,2%, *Providencia* sp. em 13,1% e *Staphylococcus aureus* em 8,1%. Entretanto, a presença de bactérias da espécie *S. aureus* pode ser devido à contaminação da pele dos pacientes e não da microbiota presente na cavidade oral da serpente (De Andrade et al., 1989). Em Taiwan, foi coletado material de abscessos de 231 pacientes picados por serpentes de diversos gêneros. As bactérias mais recorrentes entre as espécies gram-negativas foram *Morganella morganii*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Proteus vulgaris*; entre as espécies gram-positivas se destacaram o grupo de bactérias *Enterococcus* e a espécie *Bacteroides fragilis* foi a mais comum entre as bactérias anaeróbias (Chen et al., 2011). Em estudo de caso, paciente apresentou necrose duas semanas após ser picada por uma serpente da Família Viperidae e a cultura revelou sensibilidade à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (Balaji et al., 2015). Devido ao exposto o extrato aquoso de *Conarus favosus* foi avaliado frente algumas das bactérias normalmente encontradas na cavidade oral da serpente como *Escherichia coli*, e na microbiota da pele dos pacientes como *Staphylococcus aureus*. No teste de disco difusão, foi detectada inibição do crescimento de bactérias como *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Nocardia brasiliensis*, *Salmonella enteridis*, *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*. O teste de mínima concentração inibitória revelou que o extrato aquoso inibiu o crescimento das bactérias *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum* e *Nocardia brasiliensis* em todas as concentrações testadas. O crescimento da bactéria *S. aureus*, normalmente encontrada na microfauna epitelial humana (De Andrade et al., 1989; Otero et al., 2002), foi inibido até a concentração de 3 mg/mL de extrato aquoso de *C. favosus*, e a partir de 4 mg/mL ocorreu diminuição dessa inibição, o que pode ter sido ocasionado pela alta taxa de mutação das bactérias, saturação do meio ou alterações no pH que permitiu o seu crescimento da cultura bacteriana.

As metaloproteínas são proteases dependentes de zinco que desempenham um papel importante nos danos locais ocasionados nos acidentes botrópicos, por induzirem hemorragia, mionecrose, danos teciduais e inflamação (Gutiérrez and Rucavado, 2000). O presente estudo avaliou o potencial anti-hemorrágico do extrato aquoso de *Conarus favosus* utilizando a via de administração usualmente adotada pelas comunidades tradicionais, a via oral. Nestas condições tanto no pré-tratamento como no pós-tratamento houve inibição significativa da atividade hemorrágica. A inibição dos halos hemorrágicos no pós-tratamento foi de 48,6% e 66,3% para as doses de 62,49 e 124,98 mg/kg, respectivamente. Ambas as doses foram mais eficazes que o antibotrópico, que neutralizou apenas 36,5% da atividade hemorrágica. Na ação coadjuvante, o extrato só inibiu significativamente o halo hemorrágico quando administrado concomitantemente com o antiveneno, na dose de 20,83 mg/kg. O extrato aquoso de *C. favosus* havia sido testado previamente quanto ao potencial inibidor da

atividade hemorrágica do veneno de *B. atrox*, seguindo protocolo de pré-incubação, e houve redução dos halos em $73,32 \pm 7,1\%$ e $94,45 \pm 1,6\%$, para as concentrações de 1:5 e 1:10, respectivamente (Moura et al., 2013). Estudos com outras espécies vegetais como *Bellucia dichotoma* e *Humirianthera ampla* mostraram inibição de 100% da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* apenas quando utilizado o protocolo de pré-incubação (Strauch et al., 2013; Moura et al., 2014).

As fosfolipases A_2 pertencem a uma classe de enzimas que podem induzir, dependendo de sua conformação, miotoxicidade, neurotoxicidade, hemólise, cardiotoxicidade, dentre outras ações (Kini, 2003; Lomonte et al., 2003). As PLA_2 também podem desempenhar papel sinérgico com outros componentes da peçonha e assim contribuir para as ações tóxicas ocasionadas pelo veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. A ação sinérgica entre uma PLA_2 não tóxica e uma metaloprotease hemorrágica do veneno de *Bothrops alternatus*, mesmo em baixas concentrações de PLA_2 , exerceu um efeito de “destacamento” de células endoteliais pela perda da adesão ao substrato na cultura, sem envolver atividade catalítica, indicada pela falta da liberação de lactato desidrogenase citosólico, no sobrenadante da cultura de células expostas ao veneno (Bustillo et al., 2015). A redução da atividade PLA_2 do veneno de *Bothrops atrox* ocorreu de forma dose-dependente. Ao ser incorporado ao gel, o extrato de *Conarus favosus* ocasionou a redução máxima de 27,15% na dose de 124,98 mg/kg, enquanto o antibotrópico, nas mesmas condições, reduziu a hemólise em 46,55%. O extrato aquoso de *C. favosus* foi testado previamente, quanto sua atividade PLA_2 , seguindo protocolo de pré-incubação com veneno de *Bothrops atrox* e a hemólise foi reduzida em 100%, na concentração de 1:2 (w:w) (Moura et al., 2013). A mesma atividade foi testada com veneno de *Lachesis muta* pré-incubado com extrato de 12 diferentes espécies vegetais, nas concentrações de 1:10 (w:w), resultando em inibição de 100% da hemólise indireta para cinco dos extratos testados (De Paula et al., 2010). A comparação entre os métodos de incorporação de extrato aquoso ao gel e pré-incubação foi testada, pela primeira vez, com o extrato de *Bellucia dichotoma* para verificar a atividade PLA_2 do veneno de *Bothrops atrox*. A pré-incubação do veneno com extrato inibiu esta atividade em 100%, nas concentrações testadas, entretanto, não houve inibição significativa da hemólise indireta quando as mesmas concentrações foram incorporadas ao gel (Moura et al., 2014).

Na zimografia ficou evidente a ação proteolítica do veneno de *Bothrops atrox* com o surgimento de duas bandas de enzimas, as quais clivaram a gelatina, usada como substrato incorporado ao gel, no entanto, essa atividade não foi detectada no veneno pré-incubado com o extrato. Isso pode ter ocorrido pela presença de substâncias quelantes no extrato, que formaram precipitados de grande peso molecular que impedem as proteínas do veneno de penetrarem no gel, ou porque tais substâncias retiraram os íons cofatores da atividade enzimática.

O ensaio qualitativo para classes de metabólitos secundários contidos no extrato aquoso de *Conarus favosus*, preparado de acordo com o uso tradicional, confirmou, entre outras, a presença de classes de metabólitos como fenóis totais, taninos totais, taninos condensados e taninos hidrolisáveis semelhantes ao estudo anterior, o qual avaliou o extrato aquoso preparado em laboratório (Moura et al., 2013; Moura et al., 2015). Nos ensaios colorimétricos o extrato aquoso de *C. favosus* apresentou fenóis totais (25 g/100g), taninos totais (24,4 g/100g), taninos hidrolisáveis (27,2 g/100g) e taninos condensados (28,5 g/100g). Em estudo fitoquímico conduzido com 12 espécies de plantas utilizadas pelas comunidades como antiofídicas, na região de Santarém, Pará, foram encontrados valores entre 1,83 e 41,49 g/100g de fenóis totais, entre 1,51 e 32,75 g/100g de taninos totais, entre 0,67 e 35,32 g/100g de taninos hidrolisáveis e valores entre 28,51 e 68,79 g/100g de taninos condensados (Moura et al., 2015), indicando que os valores obtidos no extrato aquoso de *C. favosus* são expressivos. Os compostos fenólicos, presentes nos extratos, podem precipitar proteínas formando complexos com íons Zn^{2+} ou Ca^{2+} diminuindo assim a ação enzimática das metaloproteases que são dependentes de Zn^{2+} e das fosfolipases A_2 dependentes de cálcio e, conseqüentemente, inibir as atividades hemorrágica e miotóxica, respectivamente, ocasionadas pelos venenos do gênero *Bothrops* sp. (Patiño et al., 2012). Estes compostos fenólicos podem interagir com as proteínas do veneno que apresentem íons em suas composições, formando grandes complexos, ficando retidos e impedidos de penetrarem na malha do gel, como observado na figura 6A e comprovado no Western Blot, figura 6B. Resultados semelhantes foram observados com extrato aquoso de *C. favosus* pré-incubado com veneno de *Bothrops jararaca*, quando não houve revelação das bandas proteicas do veneno no gel e, bem como, a reação com os anticorpos do Western Blot (Moura et al., 2015).

5. Conclusão

No presente estudo mostrou que extrato aquoso das entrecasas de *Conarus favosus*, administrado na forma oral, foi eficiente no bloqueio da atividade hemorrágica local induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, reduzindo em até 66,3% essa atividade em camundongos. O extrato inibiu o crescimento da bactéria *Escherichia coli*, normalmente encontrada na cavidade oral de serpentes, e de *Staphylococcus aureus*, presente na microbiota da pele humana, demonstrando potencial antimicrobiano. O extrato apresentou, ainda, uma ação antioxidante, o que poderá contribuir como tratamento complementar das ações locais e infecções secundárias, muito frequentes nos acidentes botrópicos.

6. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das Bolsas de Produtividade (No. 303786/2013-2 e No. 307003/2013-2) à Doutora Maria Cristina dos Santos e Doutora Cecília Verônica Nunez, respectivamente, e Bolsa de Mestrado concedida à Thaís Pereira da Silva. Gostaríamos de agradecer ao CT-Agro/CNPq, PPBio/CNPq, REPENSA/CNPq/FAPEAM and CT-Amazônia/CNPq pelo suporte financeiro ao LABB. À Doutora Regina Célia Viana Martins da Silva do Laboratório de Botânica - Herbário da EMBRAPA, pela identificação botânica da espécie utilizada no presente estudo. Finalmente, os autores gostariam de agradecer ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTOX) pelo suporte financeiro (ref. nº 573790/2008-6/CNPq, 1217/2011/CAPES).

7. Referências

- Balaji, G., Kumar, A., Menon, J., 2015. Snake bite induced cellulitis leading to infected open dislocation of the first metacarpophalangeal joint—A rare complication. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*.
- Bochner, R., Fizon, J. T., Machado, C., 2014. A profile of snake bites in Brazil, 2001 to 2012. *Journal of Clinical Toxicology* 4: 1-7.
- Borges, C. C., Sadahiro, M., Dos-Santos, M. C., 1999. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32: 637-646.
- Bustillo, S., García-Denegri, M. E., Gay, C., Van De Velde, A. C., Acosta, O., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Leiva, L., 2015. Phospholipase A 2 enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. *Chemico-biological interactions* 240: 30-36.
- Cardoso, J. L. C., 2009. A fitoterapia antiveneno na medicina brasileira, in: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, 2. ed. ed. Sarvier, São Paulo, pp. 481-485.
- Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad Jr., V., 2009. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Servier.
- Chen, C.-M., Wu, K.-G., Chen, C.-J., Wang, C.-M., 2011. Bacterial infection in association with snakebite: A 10-year experience in a northern Taiwan medical center. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 44: 456-460.
- Da Silva, A. M., Bernarde, P. S., De Abreu, L. C., 2015. Accidents with poisonous animals in Brazil by age and sex. *Journal of Human Growth and Development* 25: 54-62.
- De Andrade, J. G., Pinto, R. N. L., De Andrade, A. L. S. S., Martelli, C. M. T., Zicker, F., 1989. Estudo bacteriológico de abscessos causados por picada de serpentes do gênero *Bothrops*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 31: 363-367.

- De Paula, R., Sanchez, E., Costa, T., Martins, C., Pereira, P., Lourenço, M., Soares, A., Fuly, A., 2010. Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 16: 311-323.
- Dos-Santos, M. C., 2009. Serpentes peçonhetas e ofidismo no Amazonas., in: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, 2. ed. ed. Sarvier, São Paulo, pp. 115-125.
- Eloff, J., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta medica* 64: 711-713.
- Feitosa, E. L., Sampaio, V. S., Salinas, J. L., Queiroz, A. M., Da Silva, I. M., Gomes, A. A., Sachett, J., Siqueira, A. M., Ferreira, L. C. L., Dos Santos, M. C., 2015. Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: a case-control study. *PLoS one* 10: e0132237.
- Forero, E., 1983. Connaraceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Available: <<http://reflora.ibri.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16929>> (accessed 07.10.2015).
- França, F. O. S., Málaque, C. M. S., 2009. Acidente botrópico, in: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, 2. ed. ed. Sarvier, São Paulo, pp. 81-95.
- Gonzalez, R. C., Woods, R. E., Eddins, S. L., 2009. *Digital image processing using MATLAB*. Knoxville, TN, Gatesmark Publishing.
- Grice, E. A., Kong, H. H., Renaud, G., Young, A. C., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Wolfsberg, T. G., Turner, M. L., Segre, J. A., 2008. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome research* 18: 1043-1050.
- Guerra, C. E., Xavier, A. R., Andrade, A. J. N., 2011. Watershed Threshold and Gray Level Morphology Applied to Object Detecting in Remote Sensing and Petrographics images. 12th International Congress of the Brazilian Geophysical Society. Rio de Janeiro, Brasil.
- Gutiérrez, J. M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26: 411-413.

- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., 2009. Efectos locales en el envenenamiento ofídico em América Latina, in: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, 2. ed. ed. Sarvier, São Paulo, pp. 352-375.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841-850.
- Gutiérrez, J. M., Theakston, R. D. G., Warrell, D. A., 2006. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med* 3: e150.
- Hu, S.-H., Wang, J.-C., Kung, H.-F., Wang, J.-T., Lee, W.-L., Yang, Y.-H., 2004. Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. *The Kaohsiung journal of medical sciences* 20: 591-599.
- Jacobson, T. K. B., Garcia, J., Da Costa Santos, S., Duarte, J. B., Farias, J. G., Kliemann, H. J., 2005. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão. *Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)* 35: 163-169.
- Kini, R. M., 2003. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42: 827-840.
- Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R., 1960. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn J Med Sci Biol* 13: 43-52.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227: 680-685.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Santamaría, C., 2003. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. *Toxicon* 42: 307-312.
- Matos, F. J. A., 1997. Roteiro sequencial para a prospecção de constituintes químicos de extratos de plantas, *Introdução à Fitoquímica Experimental*. UFC, Fortaleza, pp. 45-65.
- Ministério Da Saúde Do Brasil, F. N. D. S., 2001. Ofídismo, in: Funasa (Ed.), *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*, Brasília, p. 122.

- Mole, S., Waterman, P. G., 1987a. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. *Oecologia* 72: 137-147.
- Mole, S., Waterman, P. G., 1987b. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. *Oecologia* 72: 148-156.
- Monteiro-Dos-Santos, J., Conceição, K., Seibert, C. S., Marques, E. E., Ismael Silva Jr, P., Soares, A. B., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., 2011. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon* cf. *henlei*. *International Immunopharmacology* 11: 1368-1377.
- Mors, W. B., Nascimento, M. C., Pereira, B. M. R., Pereira, N. A., 2000. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. *Phytochemistry* 55: 627-642.
- Moura, V. M., Bezerra, A. N. S., Mourão, R. H. V., Lameiras, J. L. V., Raposo, J. D. A., Sousa, R. L., Boechat, A. L., Oliveira, R. B., Chalkidis, H. M., Dos-Santos, M. C., 2014. A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. *Toxicon* 85: 59-68.
- Moura, V. M., Freitas De Sousa, L. A., Cristina Dos-Santos, M., Almeida Raposo, J. D., Evangelista Lima, A., De Oliveira, R. B., Da Silva, M. N., Veras Mourão, R. H., 2015. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. *Journal of Ethnopharmacology* 161: 224-232.
- Moura, V. M., Mourão, R. H. V., 2012. Aspectos do ofidismo no Brasil e plantas medicinais utilizadas como complemento à soroterapia. *Scientia Amazonia* 1: 17-26.
- Moura, V. M., Sousa, L. a. F., Dos-Santos, M. C., Raposo, J. D. A., Lima, A. E., Oliveira, R. C., Silva, M. N., Mourão, R. H. V., 2015. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: an assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Moura, V. M., Sousa, L. a. F., Oliveira, R. B., Silva, A. M. M., Chalkidis, H. M., Silva, M. N., Pacheco, S., Moura, R. H. V., 2013. Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 7: 2330-2337.

- Nakayama, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P., Parandoosh, Z., 1997. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of immunological methods* 204: 205-208.
- Otero, R., Gutiérrez, J., Beatriz Mesa, M. A., Duque, E., Rodríguez, O., Luis Arango, J., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., María Rodríguez, L., Caro, E., Martínez, J., Cornejo, W., Mariano Gómez, L., Luis Uribe, F., Cárdenas, S., Núñez, V., Díaz, A., 2002. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 40: 1107-1114.
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Osorio, R. G., Saldarriaga, M., Díaz, A., 2000. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 233-241.
- Paracampo, N. E. N. P., 2011. *Conarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk. (Connaraceae): tradicionalmente utilizada como barbatimão no Pará. Belém, Embrapa Amazônia Oriental.
- Patiño, A. C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J. C., 2012. Evaluation of the inhibitory effect of extracts from leaves of *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) on the venom of *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica* 32: 365-374.
- Soares, S. E., 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr* 15: 71-81.
- Sousa, C. D. M., Silva, H. R., Vieira-Jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. D., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., Barros, E. D. S., Araújo, P. D. M., Brandão, M., 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* 30: 351-355.
- Sousa, L. F., Nicolau, C. A., Peixoto, P. S., Bernardoni, J. L., Oliveira, S. S., Portes-Junior, J. A., Mourão, R. H. V., Lima-Dos-Santos, I., Sano-Martins, I. S., Chalkidis, H. M., Valente, R. H., Moura-Da-Silva, A. M., 2013. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7: e2442.
- Strapazzon, J. D. O., Parisotto, E. B., Moratelli, A. M., Garlet, T. R., Bastos, J., Zimmermann, I. R., Zanin, M., Fagundes, R., Lino, M. R. D. O., Fröde, T. S., Wilhelm Filho, D., 2015. Systemic oxidative stress in victims of Bothrops snakebites. *Journal of Applied Biomedicine* 13: 161-167.

- Strauch, M. A., Tomaz, M. A., Monteiro-Machado, M., Ricardo, H. D., Cons, B. L., Fernandes, F. F., El-Kik, C. Z., Azevedo, M. S., Melo, P. A., 2013. Antiphidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. *Journal of Ethnopharmacology* 145: 50-58.
- Sun, B., Ricardo-Da-Silva, J. M., Spranger, I., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4267-4274.
- Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G., Chaves, F., 2009. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon* 54: 67-76.
- Waldez, F., Vogt, R. C., 2009. Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 39: 681-696.
- Wen, F. H., 2009. Soroterapia, in: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, 2. ed. ed. Sarvier, São Paulo, pp. 432-445.
- Who, 2009. Neglected tropical diseases: Snakebites. Available: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/> (accessed 07.10.2015).
- Willis, R. B., Allen, P. R., 1998. Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst* 123: 435-439.

CAPÍTULO III

DADOS NÃO SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO

Comparação entre o chá preparado conforme uso popular e o extrato aquoso liofilizado das cascas de *Connarus favosus* Planch. em relação à presença de metabólitos secundários, atividade antioxidante e antimicrobiana

1. Introdução

Na Região Norte, as populações ribeirinhas e indígenas enfrentam o difícil acesso aos centros de saúde para tratamento de lesões por animais peçonhentos (WEN et al. 2015), o que as levam à utilização de plantas, que acreditam ter ação antiofídica, na tentativa de inibir as ações tóxicas resultantes do envenenamento (MOURA et al., 2015). A espécie vegetal *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae) é conhecida como verônica e é comumente utilizada como antiofídica pelas comunidades tradicionais no Pará, na forma de decocção (chá) ou tintura (MOURA et al, 2015). O extrato aquoso liofilizado dessa espécie vegetal foi estudado quanto ao potencial antiofídico frente à atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*, pela via utilizada popularmente (oral), e os resultados foram promissores (SILVA et al., 2015).

A liofilização, também conhecida como criodesidratação ou criosecagem, é o processo de secagem pelo qual o material é submetido à temperaturas abaixo de -30 °C, e depois a pressão negativa (vácuo), separando a água do material vegetal por sublimação, do estado sólido (congelado) diretamente para o estado gasoso. Essa técnica de secagem é normalmente usada para enzimas, hormônios, antibióticos, vitaminas, anticorpos, vacinas inativadas, venenos e fármacos que podem ser usados para diagnóstico e ação terapêutica. Além de ossos e outros tecidos do corpo para uso cirúrgico ou médico e alimentos que necessitam manter suas propriedades organolépticas (TERRONNI et al., 2013).

A fim de estudar os potenciais da planta antiofídica *Connarus favosus*, os testes foram desenvolvidos com o extrato aquoso liofilizado proveniente das cascas secas trituradas da planta, no intuito de manter o material vegetal na forma mais próxima de seu estado natural e também obter doses como as utilizadas

popularmente. Portanto, foi comparada a presença dos metabólitos secundários no chá das cascas, preparado conforme uso tradicional (sem liofilização), e no extrato aquoso (liofilizado) de *Connarus favosus*, além de comparar os potenciais antioxidante e antimicrobiano das amostras.

2. Material e métodos

2.1 Material vegetal

2.1.1. Coleta e identificação

Exemplares de *Connarus favosus* foram coletados na Comunidade de São Pedro, Santarém - PA (Brasil, 02°32'08,9" S e 54°54'23,9" W). O ponto de coleta foi marcado pelo Sistema Global de Medição de Posição (GPS - GARMIN Map 60csx). A espécie vegetal foi identificada pela Botânica Doutora Regina Célia Viana Martins da Silva e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Embrapa Amazônia Oriental/Belém sob o código (IAN): 185216.

2.1.2. Obtenção do extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf) e doses, conforme uso tradicional.

Obtenção do extrato aquoso: Amostras de casca de *Connarus favosus*, após serem desidratadas em temperatura ambiente, foram trituradas em moinho e 30 g do pó das cascas foram diluídos em 450 mL de água destilada para o preparo do chá conforme uso tradicional, resultando na concentração de 66,666 mg/mL. A solução foi agitada a 100°C, até próximo da fervura. Em seguida a solução foi coada, filtrada em papel filtro, liofilizada e conservada em frasco âmbar em temperatura ambiente.

Obtenção da dose: Conforme uso tradicional, para a realização dos testes, uma alíquota contendo 150 mL- que é a quantidade equivalente a um copo de chá, utilizado por um indivíduo adulto de 60 kg- foi liofilizada. O peso seco final da alíquota foi de 1,25 g/copo de 150 mL e, portanto, 1,25 g/ 60kg ou 20,83 mg/kg. Essa dose foi usada como base para os cálculos das doses administradas por animal.

2.2. Determinação das classes de constituintes químicos

Seguindo o roteiro sequencial para prospecção de constituintes químicos de extratos de plantas, de MATOS (1997), foi investigada de forma qualitativa a

presença das seguintes classes de metabólitos. Previamente, foram preparados, na mesma concentração, a diluição o extrato aquoso das cascas de *Conarus favosus* e o chá, da forma tradicional, em quantidade suficiente para serem utilizados nos ensaios a seguir.

2.2.1 Fenois e taninos

Em tubos de ensaio foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico para 3mL de cada amostra. As soluções foram agitadas e observadas quanto a mudança de cor ou precipitação. Estas foram comparadas com a solução de amostra com cloreto férrico sem serem agitadas para observação dos resultados. Para presença de fenois, a colocação deve variar entre azul e vermelho. Para presença de taninos hidrolisáveis, deve ser observado precipitado escuro de tonalidade azul e para taninos condensados deve ser observado precipitado de cor verde.

2.2.2 Antocianinas, antocianidinas e flavonoides

Foram utilizados 3 tubos de ensaio para cada amostra neste teste, além das amostras puras para comparação. As amostras foram colocadas nos tubos e em seguida os primeiros tubos foram acidificados com HCl até atingirem pH 3; os segundos tubos foram alcalinizados com NaOH até pH 8,5 e os terceiros até pH 11. Para presença de antocianinas e antocianidinas deve ser observado coloração vermelha nos tubos acidificados, coloração lilás nos tubos de pH 8,5 e coloração azul-púrpura nos tubos mais alcalinos. Para presença de flavonas, flavonois e xantonas deve ser observado coloração amarela nos tubos mais alcalinos. Para presença de chaconas e aurona deve ser observado coloração vermelha nos tubos acidificados e coloração vermelho-púrpura nos tubos mais alcalinos. Para presença de flavonois deve ser observado coloração vermelho-laranja nos tubos mais alcalinos.

2.2.3 Leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

Foram utilizados 2 tubos de ensaio para cada amostra neste teste, além das amostras puras para comparação. As amostras foram inseridas nos tubos e em seguida os primeiros tubos foram acidificados com HCl até atingirem pH 1-3 e os segundos tubos foram alcalinizados com NaOH até pH 11. Após alcançarem o pH necessário, as amostras foram aquecidas nos tubos com auxílio de lâmpada de álcool durante aproximadamente dois minutos. Para presença de leucoantocianidinas deve ser observado coloração vermelha nos tubos acidificados.

Para presença de catequinas deve ser observado coloração pardo-avermelhada nos tubos acidificados. Para presença de flavononas deve ser observado coloração vermelho-laranja nos tubos alcalinizados.

2.2.4 Flavonois, flavononas, flavanonois e xantonas

Foi utilizado um tubo de ensaio para cada amostra, além das amostras puras para comparação. As amostras foram colocadas nos tubos com adição de alguns centigramas de magnésio granulado. Após o término da reação de efervescência, os tubos foram comparados com os tubos controle. Para presença de flavonois, flavononas, flavanonois e xantonas deve ser observado aparecimento ou intensificação da cor vermelha.

2.2.5 Esteroides e triterpenoides

Foi utilizado um tubo de ensaio para cada amostra. Foram adicionados 2 mL de clorofórmio às amostras e as soluções clorofórmicas foram filtradas gota a gota em tubos fechados com uma porção de algodão e coberta com alguns decigramas de Na₂SO₄ anidro. Os filtrados foram transferidos para tubos bem secos, foram adicionados 1 mL de anidridi acético e agitados suavemente. Após agitação foram adicionados cuidadosamente três gotas de H₂SO₄ concentrado e os tubos foram agitados novamente. Para presença de esteroides livres deve ser observado coloração azul seguida de verde permanente. Para presença de triterpenoides deve ser observado coloração parda até vermelha.

2.2.6 Saponinas

Os resíduos insolúveis em clorofórmio das reações anteriores foram redissolvidos em 5 mL de água destilada e filtrados. Os filtrados foram agitados vigorosamente por dois minutos. Para a presença de saponinas deve ser observado a formação de espuma persistente e abundante.

2.2.7 Alcaloides

Foi utilizado um tubo de ensaio para cada amostra. As amostras foram alcalinizadas atingindo pH 11 e em seguida tiveram as bases orgânicas extraídas com 3 porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL de uma mistura éter-clorofórmio (3+1), em funil de separação. Logo após, as soluções éter-clorofórmio foram tratadas com Na₂SO₄ anidro para eliminar excesso de água. Os filtrados tiveram as bases orgânicas re-extraídas em três porções sucessivas de HCl diluído (0,1 mol/L). As soluções éter-clorofórmio foram rejeitadas e as soluções aquosas ácidas foram repartidas em dois tubos de ensaio sem a presença do solvente orgânico. Foram

adicionados três gotas dos reagentes de precipitação de alcaloides “Hager” e “Dragendorff” nos tubos contendo as soluções originadas do extrato aquoso e do chá. Para a presença de alcaloides deve ser observado precipitação floculoso.

2.3. Teste de ação antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante do extrato e chá foi realizada utilizando os ensaios quantitativos com 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e com Fe^{3+} /Fenantrolina. O extrato aquoso liofilizado e o chá das cascas, preparado na forma tradicional, foram testados na concentração de 5 mg/mL. Para o procedimento utilizando DPPH como agente oxidante foram adicionados 990 μL da solução de DPPH e 10 μL da solução do extrato ou chá, após 30 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 517 nm. Para o procedimento usando Fe^{3+} como agente oxidante, foram utilizados 980 μL de fenantrolina e acrescentados 10 μL de uma solução padrão de Fe^{3+} e 10 μL de extrato ou chá. A leitura foi realizada após 1 hora em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 508 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão e os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4. Teste de ação antimicrobiana

A ação antimicrobiana do extrato e chá foi testada seguindo a metodologia descrita por HU et al. (2004). Placas de ágar Mueller-Hinton foram inoculadas com as bactérias teste, nas quais foram perfurados poços de 6 mm de diâmetro e inoculados 50 μL de extrato aquoso liofilizado ou chá das cascas, nas concentrações de 5 mg/mL. As placas foram mantidas em estufa por 24h e o diâmetro dos halos de inibição foi estimado com auxílio de paquímetro digital. As bactérias utilizadas no teste foram *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Edwardsiella tarda* ATCC 15974, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Nocardia brasiliensis* ATCC 19296, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Salmonella enteridis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e *Serratia marcescens* ATCC 13880. Todas as cepas foram adquiridas na Fundação André Tosello, Campinas, Brasil. Considerando o diâmetro dos halos de inibição, a atividade do extrato foi classificada como: baixa atividade (até 0,6 cm), média atividade (até 1,3

cm) e alta atividade (maior que 1,3 cm). O ensaio foi realizado em triplicata e o controle utilizado foi o antibiótico oxitetraciclina (125 µg/mL).

2.5. Análise Estatística

Os valores foram expressos como média e desvio padrão da média das amostras. A comparação entre as médias do teste de ação antioxidante foi realizada por teste *t*. A comparação entre os grupos do teste de ação antimicrobiana difusão em disco foi realizada pela análise de variância ANOVA (One-Way) e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1 Classes de metabólitos secundários

Na Tabela 1 estão expressas as classes de metabólitos secundários que foram detectadas no chá das cascas preparado conforme utilizado tradicionalmente e no extrato aquoso liofilizado de *Conarus favosus* (EACf). Em ambas as amostras foram detectadas a presença de auronas, catequinas, chaconas, esteroides, fenóis, flavonas, flavonóis, leucoantocianidinas, taninos e xantonas.

Tabela 1: Teste fitoquímico qualitativo para detecção de metabólitos secundários no chá das cascas e extrato aquoso liofilizado de *Conarus favosus* (EACf).

Classe de metabólitos secundários	Chá cascas <i>C. favosus</i>	EACf
Alcaloides	-	-
Antocianidinas	-	-
Antocianinas	-	-
Auronas	+	+
Catequinas	+	+
Chaconas	+	+
Esteroides	+	+
Fenóis	+	+
Flavanonas	-	-
Flavanonóis	-	-
Flavonas	+	+
Flavonóis	+	+
Leucoantocianidinas	+	+
Quinonas	-	-
Saponinas	-	-
Taninos	+	+
Triterpenoides	-	-
Xantonas	+	+

(-): ausência; (+): presença

3.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do chá das cascas e do extrato aquoso liofilizado de *Conarus favosus* (EACf) está demonstrada na Tabela 2. O chá das cascas possui valores equivalentes de 0,7 para o método DPPH e 1,1 para o método Fe³⁺. Já o EACf possui valores equivalentes de 1,2 para o método DPPH e 1,7 para o método Fe³⁺, em relação ao padrão do ácido ascórbico, o que demonstra alto potencial antioxidante para ambas amostras.

Tabela 2: Atividade antioxidante testada com o chá das cascas e extrato aquoso de *Conarus favosus* (EACf), ambos na concentração de 5 mg/mL, determinado pelos testes com DPPH e Fe³⁺. Ácido ascórbico [AA] foi usado como antioxidante equivalente. Valores em equivalência para *Conarus favosus* (Equiv.) 0-1,0: potencial mais alto que [AA]; 1,0-2,0: potencial alto; 2,0-4,0: potencial mediano.

Amostras	DPPH		Fe ³⁺	
	[AA] eq	Equiv.	[AA] eq	Equiv.
Chá cascas <i>C. favosus</i>	7,0 ± 0,2	0,7 ± 0,02 ^a	4,5 ± 0,3	1,2 ± 0,08 ^a
EACf	4,0 ± 0,4	1,1 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,5	1,7 ± 0,3 ^b

a, b: Na mesma coluna, valores representados por letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0.05$ verificado pelo teste t não pareado. Média ± desvio padrão ($n = 3$).

3.3. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do chá das cascas e do extrato aquoso liofilizado de *Conarus favosus* está demonstrada na Tabela 3. O extrato aquoso apresentou alta atividade inibitória apenas quando testado frente ao *Bacillus cereus*, os demais resultados demonstraram média ou baixa atividade inibitória em relação ao crescimento das bactérias. Não foi detectada inibição do crescimento de *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* para ambas as amostras.

Tabela 3: Teste de difusão em disco do chá das cascas e extrato aquoso de *Conarus favosus* (EACf), nas concentrações de 5 mg/mL, para avaliar o potencial de inibição do crescimento de *Bacillus cereus* (BC), *Corynebacterium glutamicum* (CG), *Escherichia coli* (EC), *Edwardsiella tarda* (ET), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Nocardia brasiliensis* (NB), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Pseudomonas fluorescens* (PF), *Salmonella enteridis* (SE), *Staphylococcus aureus* (SA) e *Serratia marcescens* (SM). Valores até 0,6 cm: baixa atividade; 1,3 cm: atividade mediana; acima de 1,3 cm: alta atividade.

Amostras	BC	CG	EC	ET	KP	NB	PA	PF	SE	AS	SM
EACf	1,5 ^b	1,0 ^b	0,8	-	0,7 ^c	0,8 ^a	-	-	0,8 ^b	1,0 ^b	0,8 ^a
Chá cascas <i>C. favosus</i>	1,0 ^c	0,7 ^c	*	-	0,8 ^b	0,7 ^a	-	-	0,9 ^b	0,8 ^c	0,9 ^a
Oxitetraciclina	3,5 ^a	2,5 ^a	2,3	-	1,6 ^a	0,7 ^a	-	-	1,8 ^a	2,9 ^a	0,8 ^a

a, b, c: Na mesma coluna, valores de letras distintas são significativamente diferentes entre si a $p < 0.05$, verificado por teste de Tukey.

(*): Crescimento bacteriano foi reduzido, mas não totalmente inibido; (-): Não houve inibição.

4. Discussão

Os resultados mostraram que não existe diferença em relação à presença das classes de metabólitos secundários tanto do chá das cascas quanto no extrato aquoso liofilizado de *Connarus favosus*. Entretanto, houve diferença significativa entre as amostras quando testadas quanto ao potencial antioxidante, nas metodologias DPPH e Fe^{3+} , sendo que o extrato aquoso de *C. favosus* mostrou o maior potencial antioxidante.

O teste de difusão em disco indicou que tanto o chá das cascas quanto o extrato aquoso possuem efeito inibitório sobre o crescimento de oito, dentre das onze bactérias testadas. O chá das cascas de *C. favosus* diferiu significativamente do extrato aquoso em relação à inibição das bactérias *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que o extrato aquoso possui maior potencial de inibição de crescimento das bactérias *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum* e *Staphylococcus aureus*, em relação ao chá das cascas de *C. favosus*, entretanto, o chá inibiu o crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae* de forma mais eficaz que o extrato aquoso liofilizado.

O extrato aquoso liofilizado das cascas de *Connarus favosus*, assim como ocorre com outros materiais vegetais, manteve a composição química inalterada, além de ser fácil de dissolver e reidratar no momento de uso nos experimentos. A ausência de água evita que o material liofilizado sofra ação de microorganismos, entretanto, deve ser armazenado de forma que evite contato com oxigênio para evitar a reidratação não intencional (TERRONNI et al., 2013).

5. Conclusão

Os testes concluíram que as duas amostras possuem as mesmas classes de metabolitos secundários e o extrato aquoso liofilizado se mostrou mais antioxidante que o chá das cascas. Em relação à atividade antimicrobiana, o extrato aquoso liofilizado inibiu o crescimento das bactérias de forma mais significativa que o chá, com exceção de apenas uma bactéria. Sendo assim, o extrato aquoso liofilizado das cascas de *Connarus favosus* manteve ou teve as propriedades potencializadas após a secagem, indicando que pode ser utilizado para experimentos que tem como objetivo testar o potencial antiofídico do chá usado pelas comunidades tradicionais.

6. Referências

HU, S.-H.; WANG, J.-C.; KUNG, H.-F.; WANG, J.-T.; LEE, W.-L.; YANG, Y.-H. Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 20, n. 12, p. 591-599, 2004.

MATOS, F. J. A. Roteiro sequencial para a prospecção de constituintes químicos de extratos de plantas. In: (Eds.). **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: UFC, 1997. cap. 4. p. 45-65.

MOURA, V. M.; FREITAS DE SOUSA, L. A.; CRISTINA DOS-SANTOS, M.; ALMEIDA RAPOSO, J. D.; EVANGELISTA LIMA, A.; DE OLIVEIRA, R. B.; DA SILVA, M. N.; VERAS MOURÃO, R. H. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 224-232, 2015.

SILVA, T. P.; MOURA, V. M.; SOUZA, M. C. S.; SANTOS, V. N. C.; SILVA, K. A. M. M.; MENDES, M. G. G.; NUNEZ, C. V.; ALMEIDA, P. D. O.; LIMA, E. S.; MOURÃO, R. H. V.; DOS-SANTOS, M. C. **Antioxidant and antimicrobial activities of *Connarus favosus* Planch. and its role in blocking the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom when administered by the same route as in folk medicine**. *Journal of Ethnopharmacology*, submetido JEP-D-15-03311, 2015.

TERRONI, H. C.; DE-JESUS, J. M.; ARTUZO, L. T.; VENTURA, L. V.; SANTOS, R., F.; DAMY-BENEDETTI, P., C. **Liofilização**. Revista Científica UNILAGO, v. 1, n. 1, p. 271-284, 2013.

WEN, F. H.; MONTEIRO, W. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; TAMBOURGI, D. V.; MENDONÇA-DA-SILVA, I.; SAMPAIO, V. S.; DOS-SANTOS, M. C.; SACHETT, J.; FERREIRA, L. C. L.; KALIL, J.; LACERDA, M. **Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon: Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem**. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 9, n. 5, p. e0003701, 2015.

ANEXO 1 - Carta de aceite para a publicação do artigo de revisão na Revista *Scientia Amazonia*.



Scientia Amazonia
Revista on-line <http://www.scientia.ufam.edu.br>
ISSN:2238.1910

CARTA DE ACEITE

Eu, como membro da banca de defesa de dissertação, declaro, para os devidos fins, que a revisão intitulada “**Espécies vegetais utilizadas no bloqueio da atividade hemorrágica induzida pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp. com ênfase na espécie *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae)**”, no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, na área de concentração em Ciências Biológicas, foi avaliada por mim. Portanto, recomendo a sua publicação na Revista *Scientia Amazonia*.

Atenciosamente,

Manaus, de novembro de 2015.

ANEXO II – E-mail confirmando a submissão do artigo científico à Revista *Journal of Ethnopharmacology* (ISSN: 0378.8741)

Journal of Ethnopharmacology <ees.jep.0.3519e1.ada74815@eesmail.elsevier.com>

Nov 6 em 2:18 AM

Para thaiscwb@yahoo.com.br thaiscwb@gmail.com

Dear Dr. Silva,

Your submission entitled "Antioxidant and antimicrobial activities of *Connarus favosus* Planch. and its role in blocking the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom when administered by the same route as in folk medicine." has been assigned the following manuscript number: JEP-D-15-03311.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your username is: thaiscwb@yahoo.com.br

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/JEP/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Marianne Verberne, Ph.D.
Editorial Office
Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO III - Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais.

GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo N° 43/11

Título do Projeto de Pesquisa: **Efeitos de extratos vegetais sobre atividades biológicas induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox* da região de Santarém-PA.**

Pesquisador Responsável: **Prof. Dra. Rosa Helena Veras Mourão.**

Instituição: **Universidade Federal do Oeste do Pará.**

Data do Parecer: 17/10/11.

PARECER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do COBEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

LIBERADO para o início da pesquisa sendo obrigatório a entrega neste CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

Belém, 17 de outubro de 2011.

Rosa Helena de F. Chaves
MÉDICA VETERINÁRIA
CRMV/PA 2029

M.V. Esp. ROSA HELENA DE FIGUEIREDO CHAVES
VICE-COORDENADORA DO CEUA/UEPA

ANEXO IV – Protocolo de Autorização de Acesso ao Conhecimento Tradicional Associado para fins de Pesquisa Científica sob Processo nº 01450.008934/2014-68-DPI/IPHAN.

		<p>MINISTÉRIO DA CULTURA Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional Departamento do Patrimônio Imaterial SEPS 713/913, Bloco D - 4º andar - Cep: 70.390-135 Fone: 55 (61) 2024-5401/5402 Fax: 55 (61) 2024-5420</p>
<p>Ofício nº 319/14 – GAB/DPI/IPHAN</p>		
<p>Brasília-DF, 4 de setembro de 2014.</p>		
<p>A Sua Magnificência RAIMUNDA NONATA MONTEIRO Reitora da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA Rua Vera Paz, s/n - Bairro Salé 68035-110 – Santarém - PA</p>		
<p>C/c PROFª. ROSA HELENA VERAS MOURÃO Coordenador e Orientador de Pesquisa Instituto de Biodiversidade e Florestas - IBEF Rua Vera Paz, s/n - Bairro Salé 68035-110 – Santarém - PA</p>		
<p>Assunto: Complementação de Documentação para Solicitação de Autorização de Acesso ao Conhecimento Tradicional Associado para fins de Pesquisa Científica. Processo nº 01450.008934/2014-68-DPI/IPHAN.</p>		
<p>Magnífica Reitora,</p>		
<p>1. O Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional – IPHAN foi credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN/MMA para autorizar o acesso ao Conhecimento Tradicional Associado ao Patrimônio Genético – CTA, para fins de pesquisa científica sem perspectiva econômica ou comercial, com base na Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, e no Decreto nº 3.945, de 28 de setembro de 2001, e suas alterações, nos termos da Deliberação nº 279, de 20 de setembro de 2011.</p>		
<p>2. Assim, foi recebido neste Instituto, para fins de análise, instrução e demais providências, o Processo nº 01450.008934/2014-68-DPI/IPHAN que trata da solicitação de autorização de acesso ao Conhecimento Tradicional Associado – CTA, para fins de pesquisa científica intitulada: “<i>Plantas medicinais utilizadas no tratamento de acidentes ofídicos pela população da Região Oeste do Pará, Santarém, Brasil</i>”, sendo constatada a necessidade de suprimento das pendências adiante discriminadas para o cumprimento da legislação vigente.</p>		
<p>3. Analisando a documentação verificamos que o projeto será conduzido sob o rito de regularização, e será analisado com base na Medida Provisória nº 2.186-16/2001, no Decreto nº 3.945/2001, e segundo as Resoluções CGEN Nº 35/2011, Nº 5/2003, Nº 19/2005 e Nº 37/2011.</p>		
<p>4. De acordo com o art. 3º da Resolução 35/2011 ainda estão pendentes:</p>		

continuação do ofício 319/14 GAB/DPI

VI - apresentação de anuência da comunidade indígena ou local envolvida, quando se tratar de acesso a conhecimento tradicional associado, em observância aos arts. 8º, § 1º, e 9º, inciso II, sem prejuízo da deliberação do Conselho de Gestão prevista no inciso IV do art. 11 da MP no 2.186-16, de 2001.

5. Se possível, enviar o Relatório de Obtenção do TAP, estabelecido na Resolução CGEN nº 19, art. 2º, §4º, o qual determina que todo TAP deve ser acompanhado de um relatório. Este relatório deve indicar os passos e/ou procedimentos seguidos para a obtenção Termo de Anuência Prévia – TAP junto aos à população local ou seus representantes.
6. Informamos que o trâmite do processo segue o estabelecido na Deliberação CGEN 37/2011. A agilidade no trâmite processual dependerá do atendimento às solicitações.
7. Colocamo-nos a disposição para sanar possíveis dúvidas por meio do e-mail: dpi@iphan.gov.br e pelo telefone: 61 – 2024 5417.

Atenciosamente,

CÉLIA CORSINO

Diretora do Departamento do Patrimônio Imaterial
Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional/Iphan

ANEXO V – Teste de atividade fosfolipásica A_2 : halos hemolíticos de inibição por diferentes doses do extrato aquoso de *Connarus favosus* (EACf), incorporado ao gel, frente à peçonha de *Bothrops atrox* (PBa). A) Controle Positivo (PBa); B) Controle Negativo (SAB); C) 20,83 mg/kg de EACf; D) 62,49 mg/kg de EACf; E) 124,98 mg/kg de EACf.

