



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSÉ ADOLFO HOMOONO MACHADO BITTENCOURT

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Brosimum***  
***guianense* (AUBL.) HUBER **SOBRE AS ATIVIDADES TÓXICAS DA****  
****PEÇONHA DE *Bothrops atrox* (SQUAMATA: VIPERIDAE)****

MACAPÁ  
2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSÉ ADOLFO HOMOONO MACHADO BITTENCOURT

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Brosimum guianense* (AUBL.) HUBER SOBRE AS ATIVIDADES TÓXICAS DA PEÇONHA DE *Bothrops atrox* (SQUAMATA: VIPERIDAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ensaios Biológicos

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jocivânia Oliveira da Silva

MACAPÁ  
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

Bittencourt, José Adolfo Homobono Machado.

Avaliação do efeito do extrato aquoso de *Brosimum guianense* (AUBL.) Huber sobre as atividades tóxicas da peçonha de *Bothrops atrox* (Squamata: Viperidae) / José Adolfo Homobono Machado Bittencourt; orientadora Jocivânia Oliveira da Silva. Macapá, 2013.  
95 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Repteis. 2. Serpente – Brasil. 3. Cobra – Veneno. 4. Venenos - Cobras. 5. Plantas medicinais. I. Silva, Jocivânia Oliveira da, orient. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

CDD. (22.ed). 616.942

## FOLHA DE APROVAÇÃO

José Adolfo Homobono Machado Bittencourt

Avaliação do efeito do extrato aquoso de *Brosimum guianense* (Aubl.) Huber sobre as atividades tóxicas da peçonha de *Bothrops atrox* (Squamata: Viperidae)

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.  
Área de Concentração: Ensaios Biológicos

Aprovado em 14 de março de 2013.

### Banca examinadora

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jocivânia Oliveira da Silva**

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

**Prof. Dr. Raullyan Borja Lima e Silva**

Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA)

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorane Izabel da Silva Hage Melim**

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Maria Mathes Faustino**

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

**Prof. Dr. Flavio Henrique Ferreira Barbosa (Suplente)**

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Dedico este trabalho, aos meus pais Marinely e Adenaldo, a minha avó Antonia, meu avó José Rodrigues (in memorian), meu irmão Júnior e a minha namorada Ana pelo apoio, incentivo, paciência e por estarem sempre do meu lado, obrigado!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me protege e mostra os caminhos que devo seguir.

À minha orientadora e amiga Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jocivânia Oliveira da Silva, pela orientação, cobranças, apoio e paciência a mim dedicados, obrigado!

Ao meus pais, Marinely e Adenaldo pelo amor, apoio, incentivo e ensinamentos, amo vocês!

A minha avó Antônia e ao meu avô José (in memoriam), que sempre me apoiam e incentivam.

Ao meu irmão Júnior que mesmo distante sempre me apoia.

À minha namorada Ana, pelo amor, carinho, paciência. Obrigado por sempre estar do meu lado em todos os momentos em que estamos juntos.

Aos meus familiares pelo carinho.

Ao amigo José Renato, pelo apoio e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho, obrigado!

A seu “Sabá”, pelo auxílio durante as coletas da espécie vegetal e pelo conhecimento repassado durante essas coletas, obrigado!

Aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia, Nayana, Leide, Shayanne, Camila, Rafael, Max, Alberto, Felipe, Juliana, Gabi, Gisele, Julianne, Samara e Heloana pela amizade, pelos momentos de descontração e brincadeiras e pelo árduo trabalho que tiveram ao me ajudar neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, pelo auxílio e colaboração.

Aos amigos de trabalho Kátia, Carmem, Socorro, Graça, Edna e Andressa pela compreensão e companheirismo.

À UNIFAP, que através do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS - possibilitou minha qualificação.

A Prof<sup>a</sup> Raimunda Bandeira diretora da Unidade Básica de Saúde da UNIFAP, que permitiu a conciliação de minhas atividades profissionais com a realização deste projeto.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e aos professores do programa, pelos ensinamentos.

Aos colegas de mestrado pelo compartilhamento de conhecimento durante esta etapa de nossas vidas.

Ao Banco Santander pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

## RESUMO

**Avaliação do efeito do extrato aquoso de *Brosimum guianense* (Aubl.) Huber sobre as atividades tóxicas da peçonha de *Bothrops atrox* (Squamata: Viperidae).**

No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos. A fisiopatologia dos envenenamentos causados por serpentes peçonhentas é complexo e envolve alterações locais e sistêmicas e a soroterapia é o único tratamento preconizado. Porém, o soro antiofídico não neutraliza eficientemente os efeitos locais do envenenamento botrópico. Sendo assim, a busca por compostos ativos capazes de neutralizar os efeitos locais produzidos por esses acidentes é uma necessidade evidente. No Estado do Amapá, a espécie *Brosimum guianense* (Aubl.) Huber é utilizada popularmente no tratamento de picadas por serpentes peçonhentas. No presente estudo, foram realizados ensaios *in vivo* e *in vitro* para avaliação da capacidade do EBg de inibir as atividades edematogênica, hemolítica indireta por fosfolipases A<sub>2</sub>, miotóxica, inflamatória, nociceptiva, hemorrágica e coagulante induzidas pela peçonha de *B. atrox*. Os resultados mostraram que o EBg não foi eficaz na neutralização das atividades coagulante e hemolítica indireta por fosfolipases A<sub>2</sub>, induzidas pela peçonha da serpente *B. atrox*. Nos ensaios realizados *in vivo*, o EBg não apresentou eficácia na inibição das atividades inflamatória, edematogênica e miotóxica. Porém, observou-se que o referido extrato possui compostos ativos com propriedades inibitórias sobre a nocicepção e a hemorragia desencadeadas pela peçonha em estudo. Sendo assim, torna-se necessário a realização de estudos de fracionamento e purificação do EBg e posteriores ensaios para avaliação dos efeitos destes compostos sobre as atividades tóxicas desencadeadas pela peçonha da serpente *Bothrops atrox*.

**Palavras Chaves:** Serpentes peçonhentas, Soro antiofídico, Plantas medicinais, Pau de cobra, jararaca do norte, *Bothrops atrox* e *Brosimum guianense*.



## ABSTRACT

### **Evaluation of the effect of aqueous extract of *Brosimum guianense* (Aubl.) Huber on activities toxic venom of *Bothrops atrox* (Squamata: Viperidae)**

In Brazil, *Bothrops* are responsible for 90% of snakebites. The pathophysiology of poisoning caused by venomous snakes is complex and involves local and systemic changes and serum therapy is the only treatment recommended. However, serum antiophidic not effectively neutralizes the local effects of *Bothrops* poisoning. Thus, the search for active compounds capable of neutralizing the local effects produced by these accidents is a clear need. In the State of Amapá, the specie *Brosimum guianense* (Aubl.) Huber is popularly used in the treatment of bites by venomous snakes. In this study, tests were performed in vivo and in vitro evaluation of EBG's ability to inhibit the activities edema, hemolytic indirectly by phospholipase A2, myotoxic, inflammatory, nociceptive, bleeding and coagulation induced by the venom of *B. atrox*. The results showed that the EBG was not effective in neutralizing the coagulant activities and indirectly by hemolytic phospholipase A2 induced by snake venom *B. atrox*. When tested in vivo, the EBG did not show efficacy in inhibiting inflammatory activity, myotoxic and edema. However, it was observed that this extract has active compounds with inhibitory properties and the bleeding on nociception triggered by the venom under study. Therefore, it becomes necessary for studies of fractionation and purification of EBG and subsequent tests to assess the effects of these compounds on the activities triggered by the toxic venom of *Bothrops atrox*.

**Key Words:** Venomous snakes, antiophidic serum, Medicinal plants, Snake wood jararaca do norte, *Bothrops atrox* e *Brosimum guianense*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Exemplos de animais peçonhentos. A) Escorpião (Gênero <i>Tityus</i> ). B) Aranha (Gênero <i>Phonetría</i> ). C) Serpente (Gênero <i>Bothrops</i> ). D) Lacaia (Gênero <i>Scolopendra</i> ) .....	19
<b>Figura 2</b> – Crânio de serpente peçonhenta, onde observa-se a denteção solenóglifa .....	22
<b>Figura 3</b> – A) Criança de 2 anos de idade picado três vezes por serpente do gênero <i>Bothrops</i> ( <i>Bothrops asper</i> ) na perna direita. Nota-se o inchaço (edema), extensa equimose, cianose, necrose, perda de mobilidade dos dedos, sugestivo de síndrome compartimental. Além dos efeitos locais apresentou hematúria e coagulopatia, sem choque e insuficiência renal aguda. O membro foi amputado. B) Criança de 12 anos de idade inicialmente tratado por curandeiros tradicionais, procurou atendimento médico 36 horas após grave mordida <i>B. asper</i> em uma mão. Desenvolveu síndrome compartimental com a falta de todos os movimentos voluntários da mão, dedos e da sensibilidade na região palmar, com bolhas e necrose da pele do dorso da mão e antebraço. Inchaço local nos três segmentos do membro e tronco. Além disso, o paciente apresentou anúria (insuficiência renal aguda secundária à necrose tubular aguda, necessitando de hemodiálise), coagulopatia, derrame pleural de decisão e pneumonia .....	25
<b>Figura 4</b> – Exemplar de serpente <i>Bothrops atrox</i> capturada no mês setembro de 2012 na região de Santo Antônio do Jari .....	29
<b>Figura 5</b> – A) Árvore da espécie <i>Brosimum guianense</i> . B) Folhas e frutos de <i>Brosimum guianense</i> .....	35
<b>Figura 6</b> – Determinação da dose edematogênica mínima (DEM) induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i> .....	55
<b>Figura 7</b> – Efeito do EBg sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	56
<b>Figura 8</b> – Determinação da dose hemolítica indireta por Fosfolipase A <sub>2</sub> (DHeM) induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> , incubada nos meios reacional a 37C° por 12 horas .....	57
<b>Figura 9</b> – Efeito do EBg sobre a sobre a atividade hemolítica indireta por fosfolipasas A <sub>2</sub> da peçonha de <i>B. atrox</i> , incubado nos meios de cultura a 37 C° por 12 horas .....	58
<b>Figura 10</b> – Determinação da dose miotóxica mínima (DMM) induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	59
<b>Figura 11</b> – Efeito do EBg sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	60

<b>Figura 12</b> – Efeito da administração de PBBa sobre migração celular para a cavidade peritoneal de camundongos .....	61
<b>Figura 13</b> – Efeito da administração de PBBa sobre a migração de células mononucleares para cavidade peritoneal de camundongos .....	62
<b>Figura 14</b> – Efeito da administração de PBBa sobre a migração de células polimorfonucleares para cavidade peritoneal de camundongos .....	63
<b>Figura 15</b> – Efeito do EBg sobre a migração celular induzido pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	64
<b>Figura 16</b> - Efeito do EBg sobre a migração de células mononucleares induzido pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	65
<b>Figura 17</b> - Efeito do EBg sobre a migração de células polimorfonucleares induzido pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i> .....	66
<b>Figura 18 A</b> – Dose nociceptiva mínima (DNM) induzida pela peçonha da serpente <i>B. atrox</i> – intervalo de 0-5 minutos .....	67
<b>Figura 18 B</b> – Dose nociceptiva mínima (DNM) induzida pela peçonha da serpente <i>B. atrox</i> – intervalo de 0-5 minutos .....	68
<b>Figura 19 A</b> – Efeito do EBg sobre a primeira fase da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> - intervalo de 0-5 minutos .....	69
<b>Figura 19 B</b> – Efeito do EBg sobre a segunda fase da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> - intervalo de 20-30 minutos .....	70
<b>Figura 20</b> – Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) da induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	71
<b>Figura 21</b> – Efeito do EBg sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	72
<b>Figura 22</b> – Efeito da PBBa sobre o tempo de coagulação sanguínea em plasma humano a 37°C.....	73
<b>Figura 23</b> – Efeito do EBg sobre o tempo de coagulação sanguínea em plasma humano a 37°C.....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i> .....	42
<b>Tabela 2</b> – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade hemolítica indireta induzida pela peçonha bruta de <i>Bothrops atrox</i> .....	44
<b>Tabela 3</b> – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha bruta de <i>Bothrops atrox</i> .....	46
<b>Tabela 4</b> – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade inflamatória induzida pela peçonha bruta de <i>Bothrops atrox</i> .....	48
<b>Tabela 5</b> – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade nociceptiva induzida pela peçonha bruta de <i>Bothrops atrox</i> .....	49
<b>Tabela 6</b> – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i> .....	51
<b>Tabela 7</b> – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade coagulante da peçonha bruta de <i>Bothrops atrox</i> .....	52

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Componentes da peçonha botrópica.....	23
<b>Quadro 2</b> – Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada .....	31
<b>Quadro 3</b> – Soros antiofídicos produzidos no Brasil .....	32
<b>Quadro 4</b> – Classificação Taxonômica da <i>Brosimum guianense</i> .....	35

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS

CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CK	Creatina quinase
cm	Centímetros
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DCM	Dose Coagulante Mínima
DEM	Dose Edematogênica Mínima
DHeM	Dose Hemolítica Mínima
DHM	Dose Hemorrágica Mínima
DIM	Dose Inflamatória Mínima
DMM	Dose Miotóxica Mínima
DNM	Dose Nociceptiva Mínima
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
EBg	Extrato Aquoso de <i>Brosimum guianense</i>
g	Gramas
h	Horas
i.d.	Intradérmica
i.p.	Intraperitoneal
IL-1	interleucina 1
IL-8	interleucina 8
mg	Miligrama
Kg	Kilograma
µL	Militro
mL	Militro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBBa	Peçonha Bruta de <i>Bothrops atrox</i>
PBS	Solução salina tamponada
PL <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
rpm	rotação por minuto
s.c	Subcutânea
SAB	Soro Antibotrópico
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SVMP's	Snake venoms metaloproteases
TNF-α	Fator de necrose tumoral tipo α

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
2.1	ANIMAIS PEÇONHENTOS .....	19
<b>2.1.2</b>	<b>Serpentes</b> .....	20
2.2	ACIDENTES OFÍDICOS .....	21
<b>2.2.1</b>	<b>Gênero <i>Bothrops</i> sp.</b> .....	21
2.2.1.1	Componentes da peçonha botrópica .....	23
2.2.2	Aspectos clínicos e fisiopatológicos do acidente botrópico .....	24
2.3	<i>Bothrops atrox</i> .....	28
<b>2.3.1</b>	<b>Peçonha de <i>Bothrops atrox</i></b> .....	29
2.4	SOROTERAPIA .....	30
2.5	PLANTAS MEDICINAIS .....	32
2.5.1	<i>Brosimum guianense</i> (Aubl.) Huber .....	34
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	OBJETIVO GERAL .....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
4.1	TIPO DE ESTUDO .....	38
4.2	POPULAÇÃO E AMOSTRA .....	38
<b>4.2.1</b>	<b>Animais</b> .....	38
4.3	MATERIAL VEGETAL .....	39
<b>4.3.1</b>	<b>Preparação do extrato bruto aquoso de <i>Brosimum guianense</i> (EBg)</b> .....	39
4.4	CAPTURA DAS SERPENTES .....	39
4.5	COLETA DA PEÇONHA DA SERPENTE <i>Bothrops atrox</i> .....	40
<b>4.5.1</b>	<b>Preparação das soluções de peçonha</b> .....	40
4.6	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOFÍDICAS .....	40
<b>4.6.1</b>	<b>Atividade Edematogênica</b> .....	41
4.6.1.1	Determinação da dose edematogênica mínima (DEM) da peçonha de <i>Bothrops atrox</i> .....	41
4.6.1.2	Avaliação do efeito do extrato aquoso de <i>Brosimum guianense</i> sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	41
<b>4.6.2</b>	<b>Atividade hemolítica indireta por fosfolipases A<sub>2</sub></b> .....	42
4.6.2.1	Determinação da dose hemolítica indireta mínima (DHeM) da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	43

4.6.2.2	Avaliação do efeito do extrato EBg sobre a atividade hemolítica indireta por Fosfolipases A <sub>2</sub> da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	43
<b>4.6.3</b>	<b>Atividade Miotóxica</b> .....	44
4.6.3.1	Determinação da dose miotóxica mínima (DMM) induzida pela da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	45
4.6.3.2	Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	45
<b>4.6.4</b>	<b>Atividade Inflamatória</b> .....	46
4.6.4.1	Determinação da dose inflamatória mínima (DIM) do veneno de <i>B. atrox</i> .....	46
4.6.4.2	Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade inflamatória induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	47
<b>4.6.5</b>	<b>Atividade Nociceptiva</b> .....	48
4.6.5.1	Determinação da dose nociceptiva mínima (DNM) induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	48
4.6.5.2	Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade nociceptiva induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	49
<b>4.6.6</b>	<b>Atividade Hemorrágica</b> .....	49
4.6.6.1	Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	50
4.6.6.2	Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	50
<b>4.6.7</b>	<b>Atividade Coagulante</b> .....	51
4.6.7.1	Determinação da dose coagulante mínima (DCM) da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	51
4.6.7.2	Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade coagulante da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	52
4.7	DESTINAÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS .....	52
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	54
5.1	ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA .....	54
<b>5.1.1</b>	<b>Determinação da dose edematogênica mínima (DEM) induzida Por Peçonha da <i>B. atrox</i></b> .....	54
<b>5.1.2</b>	<b>Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha da <i>B. atrox</i></b> .....	55
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA POR FOSFOLIPASES A <sub>2</sub> .....	56
<b>5.2.1</b>	<b>Determinação da dose hemolítica indireta mínima (DHIM) induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i></b> .....	56



5.2.2	<b>Avaliação do efeito do extrato de Brosimum guianense sobre a atividade hemolítica indireta fosfolipásica induzida pela peçonha <i>B. atrox</i></b> .....	57
5.3	<b>ATIVIDADE MIOTÓXICA</b> .....	58
5.3.1	<b>Determinação da dose mínima miotóxica (DMM) induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i></b> .....	58
5.3.2	<b>Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i></b> .....	59
5.4	<b>ATIVIDADE INFLAMATÓRIA</b> .....	60
5.4.1	<b>Determinação da dose inflamatória mínima (DIM) do veneno de <i>B. atrox</i></b> .....	60
5.4.2	<b>Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade inflamatória induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i></b> .....	63
5.5	<b>ATIVIDADE NOCICEPTIVA</b> .....	66
5.5.1	<b>Determinação da dose mínima nociceptiva induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i></b> .....	66
5.5.2	<b>Avaliação do Efeito do EBg sobre a atividade nociceptiva induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i></b> .....	68
5.6	<b>ATIVIDADE HEMORRÁGICA</b> .....	70
5.6.1	<b>Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i></b> .....	70
5.6.2	<b>Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i></b> .....	71
5.7	<b>ATIVIDADE COAGULANTE</b> .....	72
5.7.1	<b>Determinação da dose coagulante mínima (DCM) induzida pela peçonha de <i>B. atrox</i></b> .....	72
5.7.2	<b>Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade coagulante da peçonha de <i>B. atrox</i></b> .....	73
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	75
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84
	<b>ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa</b> .....	94
	<b>ANEXO B – Termo de Identificação da <i>B. guianense</i></b> .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os acidentes ofídicos representam sério problema de saúde pública, devido à alta frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam.

Na região norte, a serpente *Bothrops atrox* é responsável pela maioria dos envenenamentos, desencadeando ações locais e sistêmica nos indivíduos afetados. A fisiopatologia deste envenenamento pode ser muito variado dependendo da quantidade de peçonha inoculada, localização da picada, idade, condições fisiológicas da vítima e, principalmente, do tempo decorrido do acidente e o atendimento médico.

Dentre as principais atividades desencadeadas pela peçonha botrópica destacam-se as ações proteolítica, coagulante e hemorrágica que induzem quadro fisiopatológico caracterizado por intensa reação inflamatória no local da picada, caracterizada por edema, dor intensa, eritema e cianose. O agravamento desse efeito pode evoluir para mionecrose.

Além dos danos locais provocados pelo acidente com serpentes do gênero *Bothrops*, os efeitos sistêmicos como hemorragia, coagulação, distúrbios renais e alterações cardíacas são marcantes, e se não forem tratados no início, podem ocasionar o óbito da vítima.

O quadro clínico do envenenamento ofídico também pode ser agravado devido às longas distâncias existentes entre os locais de ocorrência do acidente e o atendimento médico.

O tratamento preconizado para os acidentes ofídicos é a soroterapia com imunobiológicos produzidos a partir da imunização de animais com as peçonhas das principais serpentes causadoras dos acidentes. Esses compostos neutralizam, por meio de seus anticorpos, as toxinas responsáveis pelos efeitos sistêmicos decorrentes dos envenenamentos por serpentes peçonhentas.

Entretanto, o soro antiofídico não é eficaz na neutralização dos efeitos locais produzidos pelo acidente botrópico.

Sendo assim, uma das práticas populares para tratar os acidentes ofídicos é a utilização de plantas medicinais, principalmente pela população da região amazônica.

No Estado do Amapá, as folhas de *Brosimum guianense* têm sido

utilizadas pela população local, para aliviar os efeitos decorrentes do envenenamento ofídico, na forma de cataplasmas aplicados no local da picada,

Apesar de ser uma espécie pouco estudada quimicamente e farmacologicamente, ácidos e ésteres alifáticos, bergapteno, sitosterol e estigmasterol e 3  $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -sitosterol foram isolados deste vegetal. O extrato metanólico apresentou atividade analgésica em experimentos realizados com camundongos.

Com base nos dados citados, o presente estudo teve por objetivo realizar ensaios *in vivo* e *in vitro* para avaliação da capacidade do extrato bruto aquoso das folhas de *Brosimum guianense* em inibir as atividades edematogênica, hemolítica indireta por fosfolipases A<sub>2</sub>, miotóxica, inflamatória, nociceptiva, hemorrágica e coagulante induzidas pela peçonha de *B. atrox*.

Considerando a problemática causada pelos acidentes ofídicos é necessário que estudos sobre a ação dos efeitos de plantas medicinais utilizadas popularmente no tratamento dos acidentes ofídicos, sejam realizados visando as informações obtidas com o estudo contribuam para validação ou não do conhecimento tradicional, bem como incentivar pesquisas de bioprospecção com a planta *Brosimum guianense* (Aubl.) Huber.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ANIMAIS PEÇONHENTOS

Os animais peçonhentos são aqueles capazes de produzir e inocular suas peçonhas e/ou toxinas, e englobam uma grande quantidade de espécies que estão presentes em todos os filos do Reino Animal (Figura 1) (GWALTNEY-BRANT et al., 2007; CALVETE et al., 2009).



**Figura 1** – Exemplos de animais peçonhentos. A) Escorpião (Gênero *Tityus*). B) Aranha (Gênero *Phonetria*). C) Serpente (Gênero *Bothrops*). D) Lacaia (Gênero *Scolopendra*).

Fonte: Instituto Vital Brasil, 2012.

Essas toxinas são empregadas na imobilização e captura de sua presa assim como, na defesa contra agentes agressores. Dentre esses animais destacam-

se as serpentes (LU et al., 2005; GWALTNEY-BRANT et al., 2007; RODRIGUEZ-COSTA et al., 2010; KOHLHOFF et al., 2012).

### **2.1.2 Serpentes**

Também chamadas de ofídios, são animais pertencentes ao filo Chordata, sub filo Vertebrata, classe Reptilia, ordem Squamata, sub-ordem Serpentes. Têm preferência por regiões temperadas e tropicais, ambientes úmidos como áreas de cultivo, matas e locais com grande quantidade de roedores (DA COSTA et al., 2008; CALVETE et al., 2009).

As serpentes correspondem a mais de 3.000 espécies, contudo as de interesse médico representam cerca de 10 a 14% das espécies conhecidas (WALDEZ; VOGT, 2009; MAGALHÃES et al., 2011).

Constitui um grupo de répteis que apresentam um longo corpo flexível, tendo a cabeça recoberta por placas ou escamas; os olhos redondos, com pupila vertical ou circular; a narina em número de duas, uma localizada de cada lado da cabeça, à frente dos olhos; a fosseta loreal (orifício entre o olho e a narina) que é um órgão termorreceptor e a boca com grande extensibilidade que permite que as serpentes possam ingerir animais relativamente grandes (FRANCO, 2003).

Podem ser agrupadas em dois grupos, que são distinguíveis através da capacidade de inocular a peçonha, as serpentes não peçonhentas e serpentes peçonhentas.

As serpentes não peçonhentas apresentam pupilas circulares; não possuem presas anteriores e fosseta loreal; a cauda afina gradativamente; a cabeça não é destacada do corpo e costumam ser ágeis e ter hábitos diurnos (PINHO; PEREIRA, 2001), enquanto que, as serpentes peçonhentas apresentam presas anteriores, com orifício central ou sulco; pupilas em fenda; fosseta loreal; sua cauda afina abruptamente; sendo a cabeça destacada do corpo. Têm hábitos noturnos e são em sua maioria, vagarosas (PINHO; PEREIRA, 2001).

De acordo com suas características morfológicas, as serpentes peçonhentas estão classificadas em cinco famílias: Hydrophiidae, Viperidae, Atractaspididae, Colubridae e Elapidae (WHITE; PERSSON, 1996; LU et al., 2005).

No Brasil existem cerca de 371 espécies de serpentes, sendo que dessas, 55 são de interesse médico. Elas pertencem às famílias Viperidae

(representadas pelos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*) e *Elapidae* (gênero *Micrurus*) (LIMA et al., 2009; LIRA-DA-SILVA et al., 2009; BERNADE; GOMES, 2012).

## 2.2 ACIDENTES OFÍDICOS

Estima-se que cerca de 5,4 a 5,5 milhões de pessoas no mundo sofram acidentes ocasionados por serpentes, e a grande maioria ocorre nos países localizados em regiões tropicais e subtropicais (KASTURIRATNE et al., 2008; WARRELL, 2010; WILLIANS et al., 2010; ADUKAUSKIENÉ et al., 2011).

Os envenenamentos ofídicos representam um sério problema de saúde pública, atingindo aproximadamente 420.000 mil a 2.280.000 milhões de pessoas por ano, sendo que dessas, cerca de 20.000 a 125.000 evoluem para o óbito (KASTURIRATNE et al. 2008; WARRELL, 2010; WILLIANS et al., 2010; HUANCHAHIRE et al., 2011).

Todavia, esses dados não refletem a realidade, pois a subnotificação é frequente entre os moradores de áreas rurais que têm dificuldade no acesso aos serviços de saúde (CALVETE et al., 2009; WARRELL, 2010; WILLIANS et al., 2010; BERNADE; GOMES, 2011).

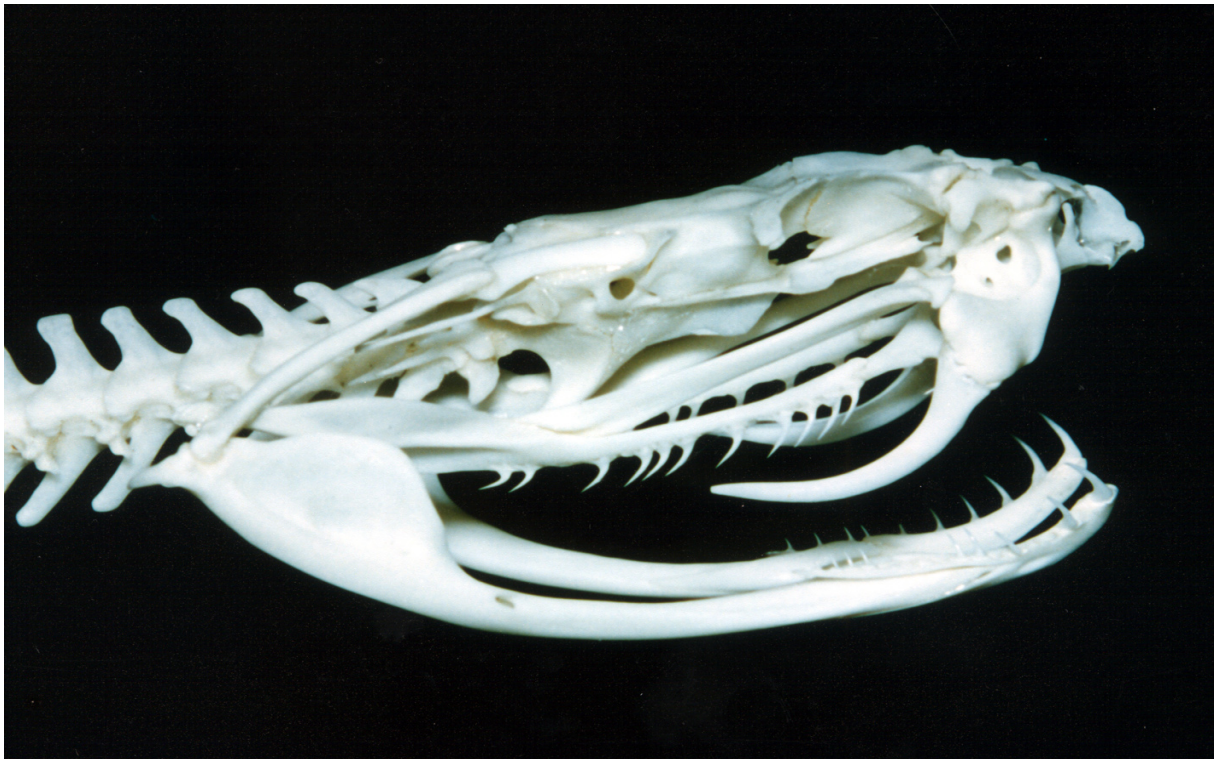
Por isso, no ano de 2009 a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a considerar esse agravo de saúde como Doença Tropical Negligenciada (DTN) com o objetivo de garantir uma maior visibilidade e, conseqüentemente, estimular a elaboração de políticas públicas visando diminuir os problemas decorrentes do envenenamento causado pelas serpentes (GUITIÉRREZ et al., 2010).

Na América do Sul, o Brasil é o país com maior incidência de acidentes ofídicos, sendo que as regiões Centro-oeste e Norte lideram em número de casos (LIMA et al., 2009; NADUR-ANDRADE et al., 2012).

### 2.2.1 Gênero *Bothrops* sp.

As serpentes do gênero *Bothrops* pertencem à família Viperidae, apresentam denticção solenóglifa (Figura 2), com presas grandes, agudas e ocas. Sua cauda é lisa, auxiliando na diferenciação entre as serpentes da mesma família

(*Crotalus* – cauda apresenta “chocalho” e *Lachesis* – cauda apresenta escamas eriçadas) (SALAZAR et al., 2007; CALVETE et al., 2011).



**Figura 2** – Crânio de serpente peçonhenta, onde observa-se a dentição solenóglifa.

Fonte: Objetos Educacionais, 2012.

O gênero *Bothrops* compreende aproximadamente 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional. As espécies mais conhecidas e que tem grande importância médica são *Bothrops atrox*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops neuwiedi* (NEIVA et al., 2009; KOHLHOFF et al., 2012).

No Brasil, as serpentes desse gênero são responsáveis por aproximadamente, 80% dos acidentes notificados. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) em 2011, dos 29.772 de acidentes causados por serpentes cerca de 22.268 (74,80%) foram atribuídos ao gênero *Bothrops* (CALGAROTO et al., 2008; NEIVA et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2008).

### 2.2.1.1 Componentes da peçonha botrópica

A peçonha botrópica é uma mistura complexa de substâncias bioativas, de natureza orgânica e inorgânica (MARKLAND, 1998; MEBS, 2001; SALDARRIGA et al., 2003; HARVEY, 2006; LALLOO, 2009). Essas substâncias encontram resumidas no quadro 1.

**Quadro 1** - Componentes da peçonha botrópica

<b>COMPONENTES DA PEÇONHA BOTRÓPICA</b>			
<b>PROTÉICOS</b>	<b><u>ENZIMÁTICOS</u></b>	<b>PEPTÍDICOS</b>	<b><u>ORGÂNICOS</u></b>
	Fosfolipases		Aminas biogênicas
	Fosfoesterases		Carboidratos
	L-aminoácido oxidase		Citratos
	Acetilcolinesterase		Nucleotídeos
	Serinoproteases		
	Metaloproteases		<b><u>INORGÂNICOS</u></b>
	Hialuronidases		
	Catalases		Cálcio
	Aminotransferases		Cobre
	Cininogenases		Ferro
	Ativadores de fator X		Potássio
			Magnésio
			Manganês
<b><u>NÃO ENZIMÁTICOS</u></b>			
Lectinas		Sódio	
Ativadores de Proteína C		Fósforo	
Fatores de Crescimento de Nervos		Cobalto	
Precursores de peptídeos bioativos		Zinco	
	Neurotóxico	<b>NÃO PROTÉICOS</b>	
	Citotóxico		
	Miotóxico		
	Potenciadores de		
	Bradicinina		
	Natriuréticos		
	Cardiotóxico		

Fonte: Adaptado de Netto, 2007.

Apesar da grande complexidade apresentada pela peçonha botrópica, cerca de 90 a 95% do peso seco correspondem a proteínas e peptídios, com destaque para as fosfolipases A<sub>2</sub>, as metaloproteases, as lectinas do tipo C e potenciadores de bradicinina (HARVEY, 2006).

As Fosfolipases A<sub>2</sub> são uma classe de enzimas que hidrolisam a ligação éster de carbono 2 dos glicerolfosfolipídios, exercendo um importante papel em vários processos fisiológicos como síntese de leucotrienos e prostaglandinas. São



responsáveis por diversos efeitos do envenenamento causado por serpentes peçonhentas como miotoxicidade, neurotoxicidade, hemólise, hipotensão, ação anticoagulante, edema e efeitos na agregação plaquetária (TEIXEIRA et al., 2003; NEIVA et al., 2009; DE ALVARENGA et al., 2011). Em estudo realizado por Huancahuire-Vega et al. (2011) com a Phtx1-PL<sub>2</sub>, uma fosfolipase A<sub>2</sub> isolada da peçonha da serpente *P. hyoprora*, promoveu o aumento da formação do edema na pata de rato, o que mostra a importância dessas enzimas no processo inflamatório.

As metaloproteases (SVMP's) são enzimas proteolíticas conhecidas como hemorraginas e são divididas em quatro classes: Classe PI (massa molecular entre 20 a 30 kDa); Classe PII (massa molecular entre 30 a 50 Kda); Classe PIII (massa molecular entre 50 a 80 kDa) e classe PIV (massa molecular entre 80 a 100 kDa). Estão envolvidas em diversos processos como: degradação de fatores da cascata da coagulação sanguínea; inibição da agregação plaquetária; necrose tecidual, edema, degradação de componentes da matriz extracelular e hemorragia (KANASHIRO et al., 2002; BALDO et al., 2008; DA SILVA et al., 2012).

As lectinas do tipo C são moléculas diméricas com massa molecular de 30 kDa e estão envolvidas com alterações de processos hemostáticos decorrentes do envenenamento ofídico interagindo com receptores plaquetários ou fatores da cascata de coagulação sanguínea. Apresentam também ação coagulante, já que se ligam ao fator de Willebrand, estimulando a agregação plaquetária. Além disso, exercem ação anticoagulante ligando aos fatores IX e X, inibindo a conversão de protombina em trombina ou ligando-se diretamente a trombina assim exercendo seu efeito anticoagulante (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006).

Os peptídeos potencializadores da bradicinina atuam na inibição da enzima conversora de angiotensinogênio e, conseqüentemente, não há a formação de Angiotensina II e assim, atua como substância vasodilatadora (NEIVA et al., 2009).

### **2.2.2 Aspectos clínicos e fisiopatológicos do acidente botrópico**

A peçonha botrópica apresenta atividade proteolítica, coagulante e hemorrágica, que induzem um quadro fisiopatológico caracterizado por intensa reação inflamatória no local da picada, caracterizada por edema, dor intensa, eritema e cianose (Figura 3), o agravamento desse efeito pode evoluir para

mionecrose (GALLAGHER et al., 2005; ESCOCARD et al., 2006; ESCALANTE et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2008; BARBOSA et al., 2008; SANCHEZ et al., 2010).



**Figura 3** – A) Criança de 2 anos de idade picado três vezes por serpente do gênero *Bothrops* (*Bothrops asper*) na perna direita. Nota-se o inchaço (edema), extensa equimose, cianose, necrose, perda de mobilidade dos dedos, sugestivo de síndrome compartimental. Além dos efeitos locais apresentou hematúria e coagulopatia, sem choque e insuficiência renal aguda. O membro foi amputado. B) Criança de 12 anos de idade inicialmente tratado por curandeiros tradicionais, procurou atendimento médico 36 horas após grave mordida *B. asper* em uma mão. Desenvolveu síndrome compartimental com a falta de todos os movimentos voluntários da mão, dedos e da sensibilidade na região palmar, com bolhas e necrose da pele do dorso da mão e antebraço. Inchaço local nos três segmentos do membro e tronco. Além disso, o paciente apresentou anúria (insuficiência renal aguda secundária à necrose tubular aguda, necessitando de hemodiálise), coagulopatia, derrame pleural de decúbito e pneumonia.

Fonte: Otero-Patiño, 2009.

A reação inflamatória é um fenômeno de natureza complexa que envolve interações entre células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e monócitos/macrófagos) e sistema vascular (ALBERTINI et al., 2007; LEITE et al., 2007).

É um mecanismo de defesa desenvolvido pelo nosso organismo, que tem como finalidade combater agentes agressores (processo infeccioso, antígeno, agentes químicos) e visa neutralizar a ação desses agentes assim como eliminar os produtos resultantes da destruição celular com o objetivo de criar um ambiente favorável para reparação tecidual (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004;

ALBERTINI et al., 2007).

Porém, se o processo de neutralização e eliminação dos agentes agressores, bem como o processo de reparo tecidual não acontecerem de forma eficiente e sincronizada, essa resposta pode acabar ocasionando uma lesão tecidual permanente devido o acúmulo de substâncias prejudiciais ao organismo, como leucócitos, colágeno e outras substâncias (NATHAN, 2002).

O primeiro a descrever este processo foi Cornelius Celsus que o identificou através de sinais cardinais: calor, rubor, edema e dor. Posteriormente, foi descrito por Virchow o quinto sinal cardinal: a perda da função ou *functio lesae* (ROCK; KONO, 2008).

Uma característica marcante do processo inflamatório é a sua resposta padrão, visto apresentar uma resposta similar em qualquer tipo de injúria (TEIXEIRA et al., 2003).

Na fase inicial (reação inflamatória aguda) ocorre alterações hemodinâmicas, caracterizadas pela vasodilatação arteriolar, com consequente, aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade microvascular (TEIXEIRA et al., 2003).

Esses eventos são regulados pela ação de vários mediadores que são liberados durante a lesão tecidual, na presença do agente agressor (alérgenos, microrganismos patogênicos, corpos estranhos e irritantes e compostos tóxicos) (MEDZHITOV, 2008).

Esse aumento da permeabilidade vascular ocorre devido a um desequilíbrio das pressões hidrostática e oncótica no plasma e tecidos, mediado pela ação duas aminas vasoativas (histamina e serotonina) e a única diferença entre elas é que a serotonina não induz a contração (vasoespamo) (LEITE et al., 2007).

A dor está presente e ocorre devido à ação direta dos mediadores inflamatórios sobre terminações nervosas levando a sensibilização (KING, 2007). Esses mediadores inflamatórios são pequenas moléculas e proteínas que agem na amplificação e terminação de tipos diferentes de respostas. Atuam por meios de receptores específicos nas células-alvo, sendo que a maioria desses mediadores tem efeitos em diversos tipos celulares (TEIXEIRA et al., 2003).

Os mediadores inflamatórios são representados por: (1) aminas vasoativas (histamina e serotonina); (2) óxido nítrico; (3) neuropeptídeos (substância P); (4) mediadores derivados de lipídeos (eicosanoides, leucotrienos e

prostaglandinas); (5) citocinas e quimiocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8); (6) cascatas de proteínas plasmáticas (fatores do complemento – C3a e C5b); (7) fator de agregação plaquetários (PAF) (KING, 2007).

Após haver lesão ou insulto ao tecido conectivo, seja devido à lesão mecânica ou à irritação química, as respostas do organismo ocorrem em etapas, sendo constituídas pela inflamação aguda, crônica, granulomatosa e choque. O estágio agudo envolve respostas vasculares e celulares durante as primeiras 24 horas, atingindo seu pico após 48 a 72 horas. Há aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação causados pelos mediadores inflamatórios conhecidos como: histamina, prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, fator ativador de plaquetas, componentes do complemento e substâncias liberadas nas terminações nervosas. Os neutrófilos são as células predominantes, às vezes associadas aos eosinófilos (KISNER; COLBY, 2005; HEDQVIST; GAUTAN; LINBOM, 2000; KING, 2007).

O estágio crônico surge à medida que a inflamação diminui (do segundo ao quarto dia), podendo durar de 14 a 21 dias após o surgimento da lesão, sendo caracterizado pelo aumento da atividade fibroblástica, formação de colágeno e tecido de granulação. Já no estágio crônico não existem sinais de inflamação, mas o paciente ainda não teve suas funções recuperadas completamente. Há a sobreposição com o estágio subagudo, ou seja, do 14<sup>o</sup> ao 21<sup>o</sup> dia após a lesão, ocorrendo nessa fase, a maturação do tecido conectivo devido ao desenvolvimento de fibras de colágeno e tecido cicatricial (KISNER; COLBY, 2005; KING, 2007).

Esse quadro pode ser agravado por infecções bacterianas decorrentes da inoculação de bactérias (*Morganella morganii*, *Proteus rettgeri*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Aeromonas hydrophila*), que habitam a cavidade oral da serpentes, durante o acidente (GALLAGHER et al., 2005; ESCOCARD et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2008; GONZÁLEZ-ANDRADE; CHIPPAUX, 2010; BARBOSA et al., 2008; OTERO-PATIÑO, 2009; SANCHEZ et al., 2010).

Além dos efeitos locais provocados pelo acidente com serpentes do gênero *Bothrops*, os efeitos sistêmicos (hemorragia, coagulação, distúrbios renais e alterações cardíacas) são marcantes e se não forem tratados no início, o quadro clínico pode agravar e evoluir para óbito.

A peçonha da família Viperidae é complexa, apresentando várias substâncias capazes de alterar as funções hemostáticas que são caracterizados

cl clinicamente por redução da coagulação sanguínea e, conseqüente, aumento do risco de sangramentos; pelo aumento dos sangramentos devido as lesões de veias e artérias; e hipovolemia, ocasionada pelo aumento do sangramento (LU et al., 2005; ZYCHAR et al., 2008).

A hemostasia é um processo complexo caracterizado por uma série de fenômenos, que envolvem a ação coordenada entre o endotélio vascular, plaquetas e o sistema de coagulação, com o objetivo de deter as lesões dos vasos sanguíneos (LU et al., 2005).

Esta resposta pode ser dividida em hemostasia primária e hemostasia secundária. A hemostasia primária envolve a ação do endotélio vascular e das plaquetas e a hemostasia secundária é decorrente da ação das proteínas plasmáticas responsáveis pela cascata de coagulação (LU et al., 2005).

As serpentes do gênero *Bothrops* apresentam em sua peçonha diversas proteínas e enzimas entre elas, metaloproteases, serinoproteases e enzimas “tipo-trombina”, que exercem um importante papel sobre a hemostasia, já que exercem diversos efeitos, entre eles destacam-se: o efeito hemorrágico e o coagulante (NEIVA et al., 2009; DE ALVARENGA et al., 2011).

A hemorragia é decorrente da ação das metaloproteases (hemorraginas) sobre a membrana basal do endotélio vascular que provoca lesão. (RIBEIRO; JORGE, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; CARDOSO et al., 2003). Além disso, a ação coagulante da peçonha, de forma isolada ou simultânea, do fator X e da protrombina, desencadeia alterações da função plaquetária, o que leva a plaquetopenia atuando de forma sinérgica o que potencializa os efeitos hemorrágicos ocasionados durante o envenenamento provocado por serpentes botrópicas (RIBEIRO; JORGE, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; CARDOSO et al., 2003).

### 2.3 *Bothrops atrox*

Na Amazônia a principal responsável pelos envenenamentos ofídicos decorrentes desses acidentes é a *Bothrops atrox* (Figura 4), conhecida popularmente como “jararaca”, “jararaca do norte”, “acuamboia”, “combóia”, “cambéua”, “surucucurana” ou “jararaca do rabo branco”. Encontra-se geograficamente distribuída no Brasil, Venezuela, Guianas, Colômbia, Equador,

Peru, Bolívia e Norte da Argentina (SALAZAR et al., 2007; NEIVA et al., 2009; SANCHEZ et al., 2010; BERNADE; GOMES, 2012).



**Figura 4** – Exemplar de serpente *Bothrops atrox* capturada no mês setembro de 2012 na região de Santo Antônio do Jari.

Fonte: Autor da pesquisa, 2012.

### 2.3.1 Peçonha de *Bothrops atrox*

A peçonha de *B. atrox* é complexa, assim como as demais peçonhas botrópicas, sendo que as PL<sub>2</sub>, SVMP's, serinoproteases correspondem por cerca de 83,5% do total de proteínas presentes na peçonha de *B. atrox*. Além dessas três outras classes como peptídeos potenciadores de bradicinina, desintegrinas, L-aminoácido oxidase, Lectinas do tipo C, que correspondem por cerca de 8 % do veneno (NUÑEZ et al., 2009).

Desses compostos diversas substâncias foram isoladas e caracterizadas biologicamente. Patiño et al. (2010), isolaram a Batx-I que é uma SVMP's pertencente a classe I que apresentou efeitos hemorrágicos e fibrinogênolíticos.

Cintra et al. (2012) isolaram e caracterizaram a Batroxase, que assim como a Batx-I pertence a classe I das SVMP's e apresenta efeitos fibrinolítico e trombolítico. Sanchez et al. (2010), caracterizaram Atrolisina-I uma SVMP exerce ação proteolítica e inibi agregação plaquetária.

Kanashiro et al. (2002), identificaram a BaPLA<sub>2</sub>I e a BaPLA<sub>2</sub>III, estão envolvidas na indução da reação inflamatória induzida pela peçonha de *B. atrox*.

Uma miotoxina altamente básica do veneno de *B. atrox*, com peso molecular aproximado de 13.500, que exerce atividades fosfolipásica A<sub>2</sub> e anticoagulante foi isolada por LOMONTE et al. (1990) através de cromatografia de troca iônica em CM - Sephadex C-25.

A trombocitina e a batroxobina, são serinoproteases que exercem efeitos sobre a hemostasia. A trombocitina é um forte ativador do fator V, também ativa os fatores VIII e XIII, cliva protrombina sem ativação, e mostra uma fraca atividade sobre o fibrinogênio, além de induzir agregação plaquetária e outras reações (KIRBY et al., 1979; ITOH et al., 1987). Já, a batroxobina é utilizada como reagente laboratorial (Reptilase) eficaz na determinação do fibrinogênio sérico. Além de ser utilizado também no tratamento de trombose - Defibrase ® Pentapharm (KIRBY et al., 1979; ITOH et al., 1987).

A batroxostatina, uma desintegrina capaz de inibir a adesão de células de melanoma a fibronectina e a agregação plaquetária induzida pelo ADP foi isolada por Rucinski et al. (1990).

Atroxina uma enzima proteolítica foi isolada da peçonha de *B. atrox* por Pantigoso et al. (1996) exercendo efeito hemorrágico e necrótico em ensaios biológicos em camundongos. A trombolectina uma lecitina também foi isolada da peçonha de *B. atrox* (GARTNER et al. *apud* STOCKER, 1990).

## 2.4 SOROTERAPIA

A terapêutica com o soro baseia-se na neutralização das ações tóxicas dos diversos componentes da peçonha, através da administração de uma solução que contém imunoglobulinas purificadas, obtidas através do plasma de equinos hiperimunizados com mistura de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* (ESPINO-SOLIS et al., 2009; PANFOLI et al., 2010).

O primeiro soro heterólogo utilizado no tratamento dos acidentes ofídicos foi desenvolvido por Calmette em 1894. Em 1901, foi Vital Brasil então diretor do recém criado Instituto Butantan que iniciou o desenvolvimento e produção de soros heterólogos contra as peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* (HAWGOOD, 1992; UTESCHER et al., 1994; ESPINO-SOLIS et al., 2009).

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para acidentes ofídicos consiste na administração, mais precoce possível, do soro antiofídico (SAB) por via intravenosa, e sua posologia depende da gravidade do acidente botrópico (Quadro 2). A complementação da soroterapia é recomendada com o uso de analgésicos, antibióticos e hidratação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

**Quadro 2** – Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada

<b>MANIFESTAÇÕES E TRATAMENTO</b>	<b>LEVE</b>	<b>MODERADO</b>	<b>GRAVE</b>
Locais (dor, edema e equimose)	Ausentes ou discretas	Evidentes	Intensas
Sistêmicas (hemorragia grave, choque e anúria)	Ausentes	Ausentes	Presentes
Tempo de Coagulação	Normal ou Alterado	Normal ou Alterado	Normal ou Alterado
Soroterapia (n° de ampolas)	2-4	4-8	12
Via de Administração	Intravenosa	Intravenosa	Intravenosa

Fonte: Ministério da Saúde, 2001.

A soroterapia é extremamente importante, visto que quando administrada logo após o acidente é capaz de reduzir a letalidade e os efeitos sistêmicos decorrentes dos envenenamentos por serpentes peçonhentas. Porém, os efeitos locais provocados pelo veneno, são apenas parcialmente neutralizados pelo soro antiofídico, sendo necessário a utilização de complementação com medicamentos e outras terapias. (PICOLO et al., 2002; FONSECA et al., 2004).

O quadro 3 apresenta informações sobre a capacidade de neutralização e os respectivos antígenos dos soros antiofídicos produzidos no Brasil.



**Quadro 3 – Soros antiofídicos produzidos no Brasil.**

<b>SORO ANTIOFÍDICO</b>	<b>CAPACIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO</b>	<b>ANTIGENO</b>
ANTIELAPÍDICO	Neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero <i>Micrurus</i> (corais)	Peçonhas de <i>M. corallinus</i> e <i>M. frontalis</i> , em iguais quantidades
ANTILAQUÉTICO	Neutraliza a peçonha de serpentes <i>Lachesis</i> (surucucu)	Peçonha de <i>Lachesis. muta</i>
ANTICROTÁLICO	Neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero <i>Crotalus</i> (cascavéis)	Peçonhas de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e <i>C.d. collilineatus</i>
ANTIBOTRÓPICO	Neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .	Peçonha <i>B. jararaca</i> (50%), <i>B. moojeni</i> , <i>B. neuwiedi</i> , <i>B. alternatus</i> e <i>B. jararacussu</i> em iguais proporções.
ANTIBOTRÓPICO-LÁQUETICO	Neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero <i>Laquesis</i> e grupo botrópico	Composto por uma mistura de peçonhas de <i>Laquesis muta muta</i> (60%) e 40% de antígeno botrópico
ANTIBOTRÓPICO-CROTÁLICO	Neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero <i>Crotalus</i> e do grupo botrópico.	O antígeno é composto por mistura de peçonhas do gênero <i>Crotalus</i> e do grupo botrópico

Fonte: Adaptado de Villar et al., 2005.

## 2.5 PLANTAS MEDICINAIS

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde. Incluem-se populações, principalmente, de países em desenvolvimento que as usam por opção ou por ser a única alternativa terapêutica disponível (CASS; COTT, 2002).

O uso de plantas medicinais com fins terapêuticos pela humanidade é descrita a milhares de anos, em livros como Pen T'Sao Ching (2.700 a.C.), Papiro de Ebers (1.500 a.C.) e na Bíblia, revelando inúmeros relatos sobre o uso de plantas e outros produtos, tanto de origem vegetal quanto animal, com propriedades terapêuticas (CHAST, 2008).

Estudos científicos têm demonstrado que as plantas medicinais apresentam um elevado potencial terapêutico, decorrente de seu rico metabolismo, em especial o secundário, que é responsável pela produção de várias substâncias químicas (HAIDA et al, 2007; RESCHKE et al, 2007; DE OLIVEIRA et al., 2009).

A facilidade e o baixo custo para obtenção das plantas, a eficiência na prevenção e no tratamento de varias enfermidades são fatores que fortalecem a medicina popular, aumentando a procura por produtos fitoterápicos (GARCIA, 1995).

Soma-se a isso, o fato do Brasil deter um vasto conhecimento tradicional e apresentar uma rica flora que colabora para a ampliação e o fortalecimento da fitoterapia e dos estudos com plantas medicinais (GARCIA, 1995; SOARES et al., 2005; POZETTI, 2005).

Além disso, as pesquisas sobre os efeitos de plantas medicinais representam uma ferramenta importante para a descoberta de novos medicamentos que possibilitarão a cura ou tratamento de diversas patologias tais como o câncer e infecções bacterianas resistentes a antibioticoterapia (McCHESNEY et al., 2007).

As plantas medicinais também podem representar uma complementação terapêutica à soroterapia, auxiliando na redução dos problemas decorrentes do envenenamento provocado por animais peçonhentos que afligem, principalmente, moradores de áreas rurais dos países em desenvolvimento (MAIORANO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009).

Assim, os estudos com plantas medicinais podem representar uma importante ferramenta na complementação da terapia convencional dos acidentes ocasionados por serpentes peçonhentas (ASUZU et al., 2003; SOARES et al, 2005).

Esse potencial é reforçado pelos diversos estudos como os realizados por Da Silva et al. (2007), que isolaram saponinas da espécie *Pentaclethra macroloba* (Wild.) Kurtze conhecida popularmente como "pracaxi", capazes de neutralizar os efeitos hemorrágicos causados pela peçonha da *Bothrops atrox*.

Magalhães et al. (2011) demonstraram que o “paracari” (*Marsypianthes chamaedrys*) mostrou ser capaz de reduzir a atividade inflamatória e coagulante induzidas pela peçonha da *Bothrops atrox*.

Outras espécies vegetais, como o “açafão” (*Curcuma longa*), “guaçotonga” (*Casearia sylvestris*), “erva-botão” (*Eclipta prostrata*), “calêndula” (*Calendula officinalis*), “alecrim bravo” (*Hypericum brasiliense*) e outras espécies demonstraram efeitos sobre tóxicos produzidos pelo envenenamento de serpentes peçonhentas (SOARES et al., 2005; AMUI et al., 2011).

### 2.5.1 *Brosimum guianense* (Aubl.) Huber

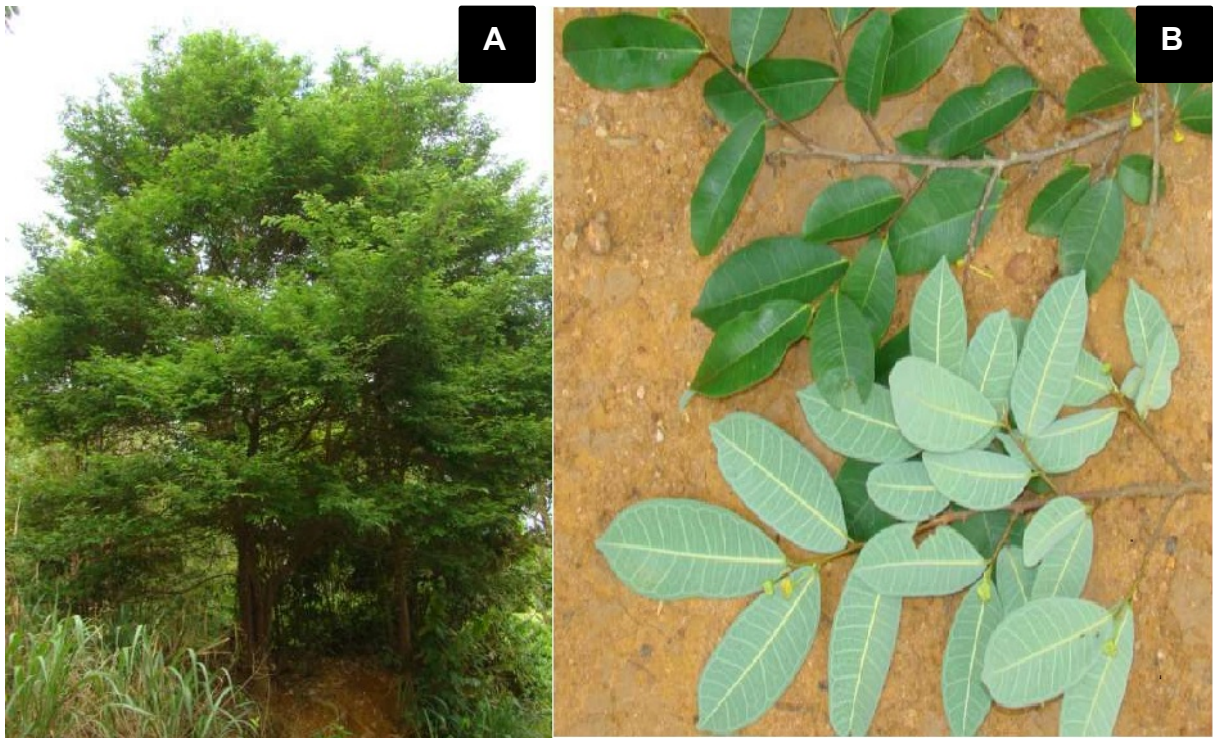
A família Moraceae é composta por várias espécies arbóreas, com aproximadamente 50 gêneros e 1.500 espécies, predominantemente tropicais e subtropicais. No Brasil está representada por 27 gêneros e 250 espécies, incluindo árvores, arbustos, ervas ou lianas, geralmente latescentes (JACOMASSI; MOSCHETA; MACHADO, 2007; PERDENEIRAS et al., 2011).

O gênero *Brosimum* compreende 15 espécies caracterizadas pelo seu porte arbóreo, porém algumas podem apresentar grande porte medindo cerca de 40 metros. Encontram-se geograficamente distribuídas no México, Antilhas, Jamaica, e em todo o Brasil, sendo encontradas em áreas de terra firme não inundáveis, e também no cerrado (TORRES et al., 1997).

A *Brosimum alicastrum* é utilizada nos países da América central como ornamentação. A *Brosimum rubescens* e *Brosimum guianense*, apresentam potencial madeireiro, os estudos realizados por Scholz et al. (2007), Reis et al. (2010) reforçam o potencial madeireiro que esta espécie apresenta.

Além disso, espécies do gênero *Brosimum* sp. são empregadas popularmente como anti-inflamatório, estimulante do sistema nervoso, tratamento de sífilis, e no tratamento reumático (TORRES et al., 1997; ABREU et al., 2010).

No Estado do Amapá, a *Brosimum guianense* (Figura 5) têm sido utilizada pela população local no tratamento dos envenenamentos ofídicos. Porém não existem estudos científicos que comprovem a sua eficácia nesses acidentes



**Figura 5** – A) Árvore da espécie *Brosimum guianense*. B) Folhas e frutos de *Brosimum guianense*.

Fonte: Lorenzi, 2009.

A classificação taxonômica da *Brosimum guianense* (Aubl.) Huber encontra-se descrita no quadro 4.

**Quadro 4** – Classificação Taxonômica da *Brosimum guianense*.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Divisão</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Subclasse</b>	Hamamelididae
<b>Ordem</b>	Urticales
<b>Família</b>	Moraceae
<b>Gênero</b>	<i>Brosimum</i>
<b>Espécie</b>	<i>Brosimum guianense</i> (Aubl.) Huber

Fonte: United State Department of agriculture, 2013.

A *Brosimum guianense* é conhecida popularmente como “amapá amargoso”, “janitá”, “pau de cobra”, “muirapinima”, “aitá”, “amapá”, “ginja de jaboti”, “janitá branco”, “amapazinho” e/ou “bosta de galinha”, é uma árvore de porte pequeno a médio, apresenta uma casca fina e dura, que quando cortada exsuda um látex branco e pegadiço (FONSECA; LISBOA; URBINATI, 2005; SCHOLZ et al., 2007; REIS et al., 2010; ALMEIDA; JARDIM, 2012).

Ramos et al. (2008) destacam o efeito inibitório *B. guianense* tem sobre o crescimento *Mycobacterium kansasii*, que é responsável por infecções pulmonares entretanto, não inibiu o *Mycobacterium tuberculosis*.

Sá et al. (2010) avaliaram a relação entre o consumo de *Apuleia leiocarpa* *Platypodium elegans* e *Brosimum guianense* com a redução populacional em um grupo de primatas da espécie *Alouatta guariba*, pois estudos fitoquímicos indicaram a presença de cumarinas que poderiam interferir no desenvolvimento de folículos ovarianos. Contudo, os resultados obtidos utilizando os extratos hidroalcoólicos de *A. leiocarpa*, *P. elegans* and *B. guianense* sugeriram que o consumo dessas plantas não está relacionado com a redução populacional observada no grupo de primatas da espécie *A. guariba*.

Dos Santos (1994), após fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das folhas obteve uma mistura de ácidos e ésteres alifáticos e bergapteno, enquanto que no extrato hexânico dos galhos isolaram o sitosterol e estigmasterol e, no extrato de acetato de etila foi isolado 3  $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -sitosterol. O extrato metanólico apresentou atividade analgésica em experimentos realizados com camundongos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do extrato bruto aquoso de *Brosimum guianense* sobre as atividades tóxicas induzidas pela peçonha da serpente *Bothrops atrox*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar a atividade inibitória, *in vitro*, do extrato bruto aquoso obtido a partir das folhas de *B. guianense*, sobre as atividades coagulante e hemolítica indireta por fosfolipases A2, induzidas pela peçonha da serpente *Bothrops atrox*.
- Investigar, *in vivo*, a capacidade do extrato bruto aquoso de *B. guianense*, de inibir as atividades inflamatória, edematogênica, miotóxica, nociceptiva e hemorrágica induzidas pela peçonha da serpente *Bothrops atrox*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. TIPO DE ESTUDO

Trata-se de uma pesquisa experimental, exploratória, com aplicação de campo de natureza quantitativa, cuja pretensão foi de realizar uma coleta prospectiva, com o objetivo geral de avaliar o efeito do extrato bruto aquoso de *Brosimum guianense* sobre as atividades tóxicas induzidas pela peçonha da serpente *Bothrops atrox*.

O presente estudo está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em concordância com a Lei Federal nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para uso científico de animais.

O projeto foi enviado à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) após o preenchimento do Protocolo para uso de animais em pesquisa e aprovada em reunião realizada no dia 24 de outubro de 2011, sob o protocolo nº009A/2011, presente no anexo A.

O presente estudo apresenta aprovação para coleta e captura de serpentes pertencentes à espécie *Bothrops atrox* no Estado do Amapá, junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, ligado ao Ministério do Meio Ambiente, sendo registrado sob o número 27228-1.

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Toxicologia e Laboratório de Fármacos do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP).

### 4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

#### 4.2.1 Animais

O estudo foi realizado em camundongos da linhagem *Swiss webster*, adultos, do sexo masculino, com peso corporal de 20 a 25 gramas (g), provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas localizado na cidade de Belém, Pará. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas, em temperatura ambiental de 22° Centígrados (C) ± 0,5°C; acondicionados em caixas de polietileno,

com grade metálica, com comida (ração Labina) e água *ad libitum* e ciclos de luz alternados de 12 em 12 horas. Os animais do sexo feminino e os que evoluíram a óbito em decorrência dos procedimentos realizados foram excluídos da pesquisa.

#### 4.3 MATERIAL VEGETAL

A coleta do material vegetal foi realizada em um terreno localizado no ramal da cascalheira que situa-se no município de Macapá, estado do Amapá. O local da coleta (Brasil, 00°2'41.821"S, 51°5'57.253"W) foi marcado através da utilização de um sistema global de medição de posição (GPS Garmin – modelo nüvi 40).

As exsiccatas foram identificadas pela Dra. Wegliane Campelo da Silva Aparício, Curadora do Herbário da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) e depositadas no herbário da referida instituição, sob o número 486. Inserir mapa

Após a coleta, as folhas de *B. guianense* foram secas em estufa de ar circulante à 42° C por 96 horas, para evitar degradação enzimática e por microorganismos. Em seguida, o material foi triturado em moinho de facas para obtenção de pó fino.

##### 4.3.1 Preparação do extrato bruto aquoso de *Brosimum guianense* (EBg)

As folhas secas e moídas foram submetidas a um processo de extração com água destilada (2.000 mL) e deixadas em infusão por 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi filtrada em gaze e posteriormente, à vácuo com papel de filtro. O extrato bruto aquoso obtido foi liofilizado e acondicionado em frasco limpo com tampa, à temperatura de – 18°C.

#### 4.4 CAPTURA DAS SERPENTES

Para a captura das serpentes foram utilizados métodos combinados de reconhecimento por encontro visual, seguido de captura com gancho herpetológico, cambão ou laço de Lutz e luvas de couro, durante o período matutino de 6:00h às 10:00h, vespertino de 16:00h às 19:00h e noturno de 20:00h às 24:00h.



Foram utilizadas também armadilhas de interceptação e queda, coleta por terceiros e encontros ocasionais em ambientes de floresta e de pastagem. Os animais capturados foram acondicionados em caixa de transporte para serpentes, com tampa móvel e abertura em acrílico menor que a caixa.

#### 4.5 COLETA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops atrox*

Primeiramente, as serpentes foram colocadas em uma câmara contendo dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para promover a anestesia das mesmas, diminuindo a agitação do animal e oferecendo mais segurança ao técnico manipulador. Em seguida, foi realizada a abertura da boca da serpente, apoiando-se as presas em um recipiente de vidro envolto em gelo, para onde flui a peçonha. Foi realizada manualmente uma ligeira compressão nas glândulas atrás da cabeça. Logo após a coleta da peçonha foi realizada a assepsia da boca da serpente, utilizando-se clorexidina. A peçonha foi liofilizada e armazenado a – 20°C.

##### 4.5.1 Preparação das soluções de peçonha

A peçonha bruta liofilizada da serpente *Bothrops atrox* foi dissolvida em solução salina tamponada (PBS) e centrifugada a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos em centrífuga Excelsa Baby. Uma alíquota de sobrenadante foi separada para dosagem de proteínas, através do método de microbiureto. Depois a solução estoque de peçonha foi diluída com PBS para a realização dos experimentos.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOFÍDICAS

O EBg, em diferentes concentrações, foi avaliado quanto à sua capacidade de inibir as atividades edematogênica, atividade hemolítica indireta por fosfolipases A<sub>2</sub>, miotóxica, inflamatória, nociceptiva, coagulante e hemorrágica induzidas pela peçonha da serpente *Bothrops atrox*.

#### 4.6.1 Atividade edematogênica

Para a determinação da atividade edematogênica das peçonhas foi utilizado o método de Yamakawa et al. (1976), com algumas modificações. Estes experimentos foram realizados com camundongos machos, com peso entre 20-25 g. Os resultados foram expressos espessura (mm) das patas dos animais  $\pm$  erro padrão.

##### 4.6.1.1 Determinação da dose edematogênica mínima (DEM) da peçonha de *Bothrops atrox*

A dose edematogênica mínima (DEM) foi determinada através da mensuração da espessura da pata direita posterior de camundongos nos intervalos de 0; 1; 2; 3 e 4 horas após a injeção intradérmica (i.d.) na região sub-plantar da pata posterior direita de diferentes concentrações de peçonha de *B. atrox* (0,05; 0,10; 0,20 mg/Kg). Essa mensuração foi feita com o auxílio de um paquímetro de baixa pressão 0,01 mm de marca Mytutoyo.

##### 4.6.1.2 Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha de *B. atrox*

Nesta etapa, utilizou-se camundongos distribuídos aleatoriamente em oito grupos de cinco animais cada.

Para a avaliação da capacidade do EBg de inibir o edema, diferentes concentrações do extrato (1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg de EBg/Kg/25  $\mu$ L PBS) foram misturadas com a peçonha bruta de *B. atrox* (0,20 mg/25  $\mu$ L PBS), e imediatamente após, 50  $\mu$ L desta mistura foi administrada intradermicamente na região sub-plantar da pata posterior direita dos animais (Tabela 1). Os animais dos grupos controles receberam somente PBS (50  $\mu$ L); PBBa (2 DEM/Kg/50 $\mu$ L PBS) ou EBg (10 mg/Kg/50  $\mu$ L PBS).

**Tabela 1** – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

GRUPO	PEÇONHA BRUTA (mg/Kg)	EXTRATO DA PLANTA (mg/Kg)
PBS	-	-
PBBa	2 DEM	-
EBg	-	10,0
EBg (1:6)	2 DEM	1,25
EBg (1:12)	2 DEM	2,5
EBg (1:25)	2 DEM	5,0
EBg (1:37)	2 DEM	7,5
EBg (1:50)	2 DEM	10,0

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. PBS= Solução salina tamponada; PBBa= Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*; EBg= Extrato aquoso de *Brosimum guianense*; DEM= dose edematogênica mínima; N=5.

#### 4.6.2 Atividade hemolítica indireta por fosfolipases A<sub>2</sub>

A atividade hemolítica indireta por Fosfolipases A<sub>2</sub> foi determinada pelo método de hemólise radial indireta (GUTIÉRREZ et al., 1988), realizado em placas de petri contendo gema de ovo, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, agarose 1% e azida sódica 0,005%.

Após a solidificação do gel nas placas, foram feitos orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) para a aplicação das amostras. Os meios de cultura foram incubados em estufa a 37°C por 12 horas. Após esse período, realizou-se a avaliação da atividade hemolítica indireta por Fosfolipases A<sub>2</sub> através da medição dos diâmetros dos halos translúcidos, formados em torno dos orifícios onde foram aplicadas as amostras.

O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira consistiu na determinação da dose hemolítica indireta mínima (DHeM) e a segunda etapa avaliou o efeito do EBg sobre a atividade hemolítica indireta por Fosfolipases A<sub>2</sub> induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

#### 4.6.2.1 Determinação da dose hemolítica indireta mínima (DHeM) da peçonha de *B. atrox*

A DHeM foi determinada através da leitura do halo translúcido formado por diferentes concentrações da peçonha de *B. atrox* (10; 15; 20; 25; ou 30 µg PBBa/40µL PBS) inoculadas em meios contendo gel formado a partir da preparação de ágar fundido contendo TRIS 20mM, cloreto de cálcio e gemas de ovo. Após a inoculação da peçonha de *B. atrox*, os meios foram incubados por um período de tempo de 12 horas a 37 °C Foi realizada a leitura da medida dos diâmetros dos halos translúcidos, formados em torno dos orifícios onde foram aplicadas as amostras.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como média e erro padrão. A DHeM escolhida foi a dose capaz de formar um halo de 10 mm no meio de cultura.

#### 4.6.2.2 Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade hemolítica indireta por Fosfolipases A<sub>2</sub> da peçonha de *B. atrox*

Para avaliar a capacidade do extrato de inibir a atividade hemolítica indireta induzida pela peçonha de *B. atrox*, diferentes concentrações do EBg (26; 52; 104; 208; 416 µg/ 20 µL) foram misturadas com a peçonha bruta de *B. atrox* (20 µg/25 µL PBS), e imediatamente após, 50µL desta mistura foi inoculada nos orifícios do meio de cultura (Tabela 2). Foram utilizados três grupos controles: PBS (50 µL), PBBa (20 µg / 25µL PBS) e EBg (416 µg/ 25µL PBS).

**Tabela 2** – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade hemolítica indireta induzida pela peçonha bruta de *Bothrops atrox*.

GRUPO	PEÇONHA BRUTA (mg/Kg)	EXTRATO DA PLANTA (µg/ml)
PBS	-	-
PBBa	2 DHeM	-
EBg	-	416
EBg (1:1)	2 DHeM	26
EBg (1:2)	2 DHeM	52
EBg (1:5)	2 DHeM	104
EBg (1:10)	2 DHeM	208
EBg (1:20)	2 DHeM	416

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. PBS= Solução salina tamponada; PBBa= Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*; EBg= Extrato aquoso de *Brosimum guianense*; DHeM= dose hemolítica indireta mínima; N= 3.

#### 4.6.3 Atividade Miotóxica

A atividade miotóxica foi determinada utilizando o método de quantificação de níveis séricos da enzima creatina quinase (KAPLAN; PESCE, 1986). O princípio deste método consiste na reação da creatina fosfato e a adenosina fosfato (ADP), catalisada pela enzima creatina quinase, formando creatina e adenosina trifosfato (ATP). O ATP formado é utilizado para fosforilar glicose, produzindo glicose-6-fosfato (G-6-P) na presença da hexoquinase, a glicose-6-P é então oxidada a gluconolactona-6-fosfato na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP<sup>+</sup>), sendo esta reação catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase. Na última reação descrita o NADP<sup>+</sup> é reduzido a NADPH aumentando a absorvância aferida em comprimento de onda de 340 nm. A variação em absorvância é diretamente proporcional à atividade da enzima creatina quinase. A atividade foi expressa em unidades/litro. Uma unidade consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto (STÁBELI et al., 2006).

#### 4.6.3.1 Determinação da dose miotóxica mínima (DMM) induzida pela peçonha de *B. atrox*

Nesta avaliação utilizou-se camundongos distribuídos aleatoriamente em seis grupos de cinco animais cada.

Para a determinação da dose miotóxica mínima diferentes concentrações de peçonha de *B. atrox* (0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 mg/Kg/ 50 µL PBS) foram administradas no músculo gastrocnêmio da pata direita dos camundongos. Os animais do grupo controle receberam somente 50 µL de PBS.

As amostras de sangue foram colhidas três horas após, por punção venosa retro orbital. Em seguida, a amostra foi centrifugada e o plasma obtido foi utilizado para a determinação da enzima creatina quinase (CK) utilizando-se o Kit de diagnóstico diagnóstico CK-NAC Liquiform (LABTEST). As leituras das absorbâncias foram feitas com comprimento de 340 nm a 37°C em espectrofotômetro BIOPLUS 2000.

#### 4.6.3.2 Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de *B. atrox*

Para avaliar a capacidade do EBg sobre a atividade miotóxica, diferentes concentrações do extrato (1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg de EBg/Kg/25 µL PBS) foram misturadas com a peçonha *B. atrox* (0,20 mg/25 µL PBS), e imediatamente após, 50 µL desta mistura foi administrada através de injeção i.m. no músculo gastrocnêmio da pata direita dos camundongos (Tabela 3). Os animais dos grupos controles receberam somente PBS (50 µL); PBBa (2 DMM/Kg/50µL PBS) ou EBg (10 mg/Kg/50 µL PBS).

As amostras de sangue foram colhidas 3 horas após, por punção venosa retro orbital. Em seguida, a amostra foi centrifugada e o plasma obtido foi utilizado para a determinação da quantitativa da atividade da Creatina Quinase Total (CK) utilizando-se o Kit de diagnóstico diagnóstico CK-NAC Liquiform (LABTEST). As leituras das absorbâncias foram feitas com comprimento de 340 nm a 37°C em espectrofotômetro BIOPLUS 2000.

**Tabela 3** – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha bruta de *Bothrops atrox*.

GRUPO	PEÇONHA BRUTA (mg/Kg)	EXTRATO DA PLANTA (mg/Kg)
PBS	-	-
PBBa	2 DMM	-
EBg	-	10
EBg (1:6)	2 DMM	1,25
EBg (1:12)	2 DMM	2,5
EBg (1:25)	2 DMM	5,0
EBg (1:37)	2 DMM	7,5
EBg (1:50)	2 DMM	10

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. PBS= Solução salina tamponada; PBBa= Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*; EBg= Extrato aquoso de *Brosimum guianense*; DMM= dose miotóxica mínima; N=5.

#### 4.6.4 Atividade Inflamatória

A atividade inflamatória foi determinada através da avaliação da reação inflamatória induzida por peritonite (SOUZA; FERREIRA, 1985).

##### 4.6.4.1 Determinação da dose inflamatória mínima (DIM) da peçonha de *B. atrox*.

Para a determinação da dose inflamatória mínima capaz de promover migração leucocitária diferentes concentrações de peçonha de *B. atrox* (0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 mg/Kg/ 50 µL PBS) foram administradas por via intraperitoneal nos camundongos.

Após quatro horas da administração das diferentes concentrações de peçonha, os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), e posteriormente, injetou-se 2 mL de PBS heparinizado (1% v/v) na cavidade peritoneal. O lavado peritoneal obtido foi submetido a contagem total de leucócitos e a contagem diferencial das células. Para realização da contagem total, 20 mL do lavado peritoneal foram diluídos em 0,4 mL da solução de Turk. A contagem total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer. Parte do lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi suspenso em 0,4 mL

de uma solução de albumina a 3% em PBS p/v. O esfregaço celular foi preparado em lâmina. Os esfregaços foram coradas com corante pancrômico de Rosenfeld e contadas em microscópio óptico, usando-se objetiva de imersão em óleo (SOUZA; FERREIRA, 1985).

#### 4.6.4.2 Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade inflamatória induzida pela peçonha de *B. atrox*

Nesta etapa, a dose de peçonha utilizada para induzir a peritonite foi de 0,20 mg/Kg.

A avaliação a capacidade do EBg sobre a atividade inflamatória induzida pela peçonha de *B. atrox*, foi realizada utilizando-se diferentes concentrações do extrato (1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg de EBg/Kg/25 µL PBS) misturados com a peçonha bruta de *B. atrox* (0,20 mg/ 25 µL PBS) e imediatamente após isso, 50 µL desta mistura foi administrada por via i.p.

A migração celular foi analisada, 4 horas após a administração dos tratamentos. Para isso, os camundongos foram eutanasiados em câmara CO<sub>2</sub> e, posteriormente, foram injetados 2 mL de PBS heparinizado (1 mL/1000 mL de PBS) na cavidade peritoneal. Foram realizadas a contagens total e diferencial do lavado peritoneal.

Para realização da contagem total, 20 µL do lavado peritoneal foram diluídos em 0,40 mL da solução de Turk. A contagem foi realizada, em câmara de Neubauer. Parte do lavado peritoneal foi centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos; o sobrenadante suspenso em 0,4 mL de uma solução de albumina a 3% em PBS p/v. O esfregaço celular foi feito em lâmina própria. Os esfregaços celulares foram coradas com o corante pancrômico de Rosenfeld e contadas em microscópio óptico, usando-se objetiva de imersão em óleo (SOUZA; FERREIRA, 1985). Os animais dos grupos controles receberam somente PBS (50 µL); PBBa (2 DIM/Kg/50µL PBS) e EBg (10 mg/Kg/50 µL PBS).



**Tabela 4** – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade inflamatória induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

GRUPO	PEÇONHA BRUTA (mg/Kg)	EXTRATO DA PLANTA (mg/Kg)
PBS	-	-
PBBa	2 DIM	-
EBg	-	10
EBg (1:6)	2 DIM	1,25
EBg (1:12)	2 DIM	2,5
EBg (1:25)	2 DIM	5,0
EBg (1:37)	2 DIM	7,5
EBg (1:50)	2 DIM	10

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. PBS= Solução salina tamponada; PBBa= Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*; EBg= Extrato aquoso de *Brosimum guianense*; DIM= dose inflamatória mínima; N= 5.

#### 4.6.5 Atividade Nociceptiva

Para a determinação desta atividade foi utilizado o método de Hunskaar et al. (1985), com modificações de Sousa et al. (2012).

##### 4.6.6.1 Determinação da dose nociceptiva mínima (DNM) induzida pela peçonha de *B. atrox*

Primeiramente, foi determinada a dose de peçonha capaz de produzir atividade nociceptiva (dor) na pata dos animais. Para isso, foram utilizados camundongos, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, contendo cinco animais cada. Depois foi realizada a injeção subcutânea (s.c.), na região subplantar da pata posterior direita, da peçonha bruta em diferentes concentrações (0,05; 0,1; 0,2 mg/Kg), onde posteriormente foi avaliada a atividade nociceptiva, nos intervalos de 0-5 minutos (após aplicação da peçonha) e 15 minutos - 30 minutos (após a injeção).

#### 4.6.5.2 Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade nociceptiva induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Após a determinação da dose de peçonha capaz de induzir a atividade nociceptiva, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos, onde cada grupo continha 5 camundongos (Tabela 5). O extrato em diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10 mg/ Kg/ 25 µL PBS) foi misturado com a peçonha (0,20 mg/Kg/ 25 µL PBS), e imediatamente após foram administrados 50 µL desta mistura, posteriormente foi avaliada a atividade nociceptiva, nos intervalos de 0-5 minutos (após aplicação da peçonha) e 15 minutos - 30 minutos (após a injeção).

**Tabela 5** – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade nociceptiva induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

GRUPO	PEÇONHA BRUTA (mg/Kg)	EXTRATO DA PLANTA (mg/Kg)
PBS	-	-
PBBa	2 DNM	-
EBg	-	10,0
EBg (1:6)	2 DNM	1,25
EBg (1:12)	2 DNM	2,5
EBg (1:25)	2 DNM	5,0
EBg (1:37)	2 DNM	7,5
EBg (1:50)	2 DNM	10,0

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. PBS= Solução salina tamponada; PBBa= Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*; EBg= Extrato aquoso de *Brosimum guianense*; DNM= dose nociceptiva mínima; N=5.

#### 4.6.6 Atividade Hemorrágica

A hemorragia foi induzida através de injeções realizadas intradermicamente (i.d.) no dorso de camundongos. Após 2 horas, os animais foram eutanaziados em câmara de CO<sub>2</sub>. A pele próxima ao local da injeção foi retirada e o halo hemorrágico formado foi medido em milímetros (mm) segundo o método de KONDO et al. (1960).

#### 4.6.6.1 Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) da peçonha de *B. atrox*

Utilizou-se camundongos distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de cinco animais cada, permanecendo em repouso para adaptação por 24 horas. Foram administradas doses crescentes da peçonha de serpente *Bothrops atrox* (0,20; 0,40; 0,60; 0,80 mg/Kg/ 50 µL PBS) no dorso dos animais. Após 2 horas, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e em seguida os halos hemorrágicos foram medidos em mm.

A dose hemorrágica mínima (DHM), é definida como a menor quantidade de peçonha, que injetada na pele do dorso é capaz de produzir uma lesão hemorrágica (halo hemorrágico) de 10 mm de diâmetro.

#### 4.6.6.2 Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. atrox*

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos de 4 animais. A indução da hemorragia foi feita com 2 DHM da peçonha ( 0,40 mg/Kg/25 µL PBS). O EBg em diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10 mg/ Kg/ 25 µL PBS) foi misturado, individualmente, com o veneno (0,40 mg/Kg/ 25 µL PBS) e imediatamente após, administrou-se 50 µL desta mistura aos animais, por via i.d. (Tabela 6). Nos animais do grupo controle PBS foram administrados 50 µL de PBS. Os animais do grupo controle PBBa receberam somente peçonha (0,40 mg/Kg/ 50 µL PBS), enquanto que os animais do grupo controle do EBg (10 mg/Kg/ 50 µL PBS) receberam somente o extrato por via i.d. Após 2 horas, os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. A área hemorrágica foi medida e os diâmetros submetidos à análise estatística.

**Tabela 6** – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

GRUPO	PEÇONHA BRUTA (mg/Kg)	EXTRATO DA PLANTA (mg/Kg)
PBS	-	-
PBBa	2 DHM	-
EBg	-	10,0
EBg (1:3)	2 DHM	1,25
EBg (1:6)	2 DHM	2,5
EBg (1:12)	2 DHM	5,0
EBg (1:18)	2 DHM	7,5
EBg (1:25)	2 DHM	10,0

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. PBS= Solução salina tamponada; PBBa= Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*; EBg= Extrato aquoso de *Brosimum guianense*; DHM= Dose hemorrágica mínima; N= 5 .

#### 4.6.7 Atividade coagulante

A atividade coagulante foi realizada utilizando plasma humano (200 µL), incubado em banho-maria a 37° C por 5 min. Após este intervalo de tempo foi adicionado diferentes concentrações da peçonha bruta e/ou do inibidor a ser testado baseou-se no método descrito por Theakston e Reid (1983).

##### 4.6.7.1 Determinação da dose coagulante mínima (DCM) da peçonha de *B. atrox*

A determinação da dose coagulante mínima (DCM) da peçonha de *Bothrops atrox* foi realizada utilizando plasma humano (200µL) com citrato de sódio, incubado em banho-maria a 37°C por 5 min. Após este intervalo de tempo foi adicionado diferentes concentrações da peçonha bruta a ser testado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e erro padrão.

Para a obtenção da DCM foram utilizadas diferentes concentrações da peçonha (2,5; 5,0; 6,5; 10,0; 12,5 µg/ 25 µL PBS). Para completar o volume final de 50 µL, foi adicionado mais 25 µL PBS a cada amostra testada. A dose coagulante mínima é definida como aquela capaz de coagular o plasma em tempo de 60 segundos.

#### 4.6.7.2 Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade coagulante da peçonha de *B. atrox*

Foi utilizada 2 DCM da peçonha para indução da atividade coagulante. Em tubos de ensaio foram misturados 2 DCM da peçonha (20 µg) com 25µL de extrato em diferentes concentrações (26; 52; 104; 208; 416 µg/25 µL PBS), e imediatamente após foi aplicado 50µL desta mistura ao plasma humano (200µL). Foram utilizados três grupos controles: PBS (50µL), PBBa (20 µg/ 25µL PBS) e EBg (416µg/ 25µL PBS) (Tabela 7).

**Tabela 7** – Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade coagulante da peçonha de *Bothrops atrox*.

GRUPO	PEÇONHA BRUTA (mg/Kg)	EXTRATO DA PLANTA (µg/ml)
PBS	-	-
PBBa	2 DCM	-
EBg	-	416
EBg (1:1)	2 DCM	26
EBg (1:2)	2 DCM	52
EBg (1:5)	2 DCM	104
EBg (1:10)	2 DCM	208
EBg (1:20)	2 DCM	416

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. PBS= Solução salina tamponada; PBBa= Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*; EBg= Extrato aquoso de *Brosimum guianense*; DCM= dose coagulante mínima; N= 3.

#### 4.7 DESTINAÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS

Ao final de cada experimento os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub> (Laboratório de Fármacos). As carcaças dos animais foram então descartadas com os resíduos biológicos da UNIFAP, e coletados através de uma empresa especializada (MVB Serviços) para que fossem incinerados.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos a partir dos experimentos foram analisados pelos softwares InStat e Graph Pad Prism versão 5 e expressos através da Média  $\pm$  Erro Padrão. Foram organizados e distribuídos na forma de figuras.

Para análise estatística foram utilizados análise de variância (ANOVA) acompanhado do teste de Tukey-Kramer. Os resultados com nível de significância estatística de 5% ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.

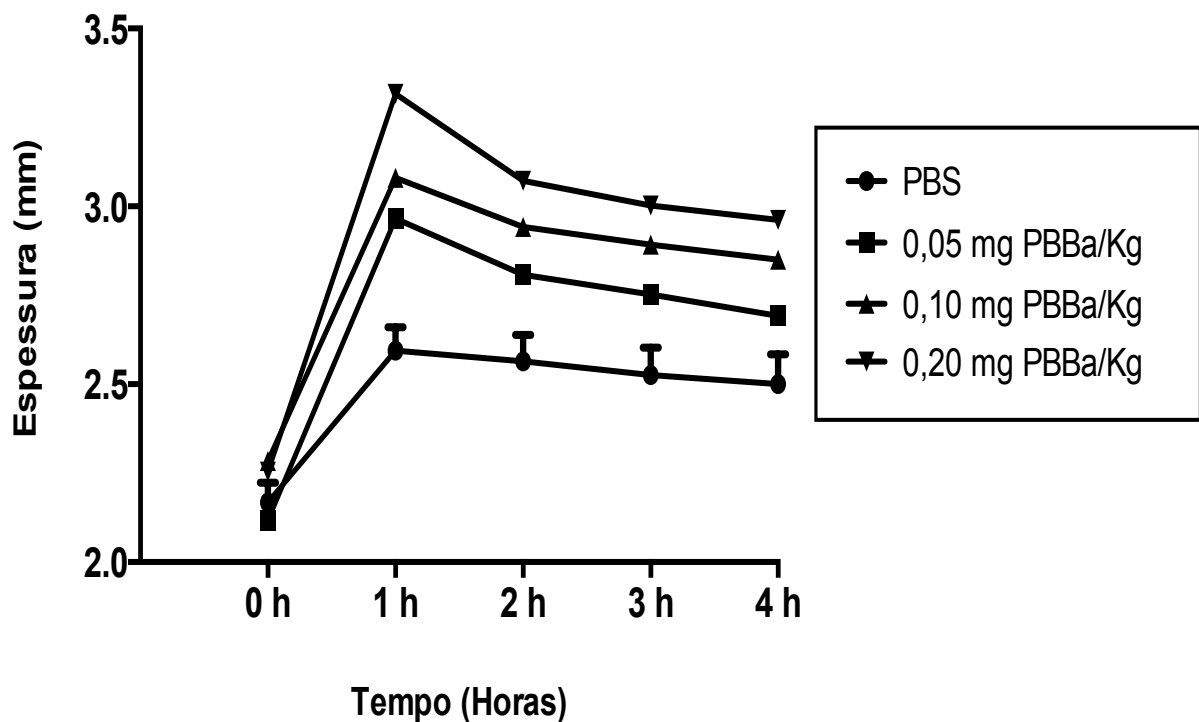
## 5. RESULTADOS

### 5.1 ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA

#### 5.1.1 Determinação da dose edematogênica mínima (DEM) induzida por peçonha de *Botrophi atrox*

A Figura 6 ilustra a determinação da dose edematogênica mínima induzida pela peçonha de *B. Atrox* após 1 hora da administração da peçonha, observou-se o aumento máximo da espessura das patas dos camundongos sendo que, após este tempo houve a redução gradual do edema.

Após análise estatística, tanto a dose de 0,10 mg/Kg quanto a de 0,20 mg/Kg promoveram um aumento na espessura da pata estatisticamente significativa ( $3.08 \pm 0.13$ ,  $p < 0.001$ ;  $3.31 \pm 0.10$ ,  $p < 0.001$  respectivamente) quando comparadas com o grupo controle (PBS). A concentração selecionada para a indução do edema nos experimentos de avaliação do efeito do EBg foi a de 0,10 mg/Kg, responsável pelo aumento de 30 % na espessura da pata dos camundongos.



**Figura 6** – Determinação da dose edematogênica mínima (DEM) induzida pela peçonha de *Botrophs atrox*.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50 $\mu$ L PBS; 0,05 mg PBBa/Kg/50  $\mu$ L PBS; 0,10 mg PBBa/Kg/50  $\mu$ L PBS; 0,20 mg PBBa/Kg/50 $\mu$ L. N= 5. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão.

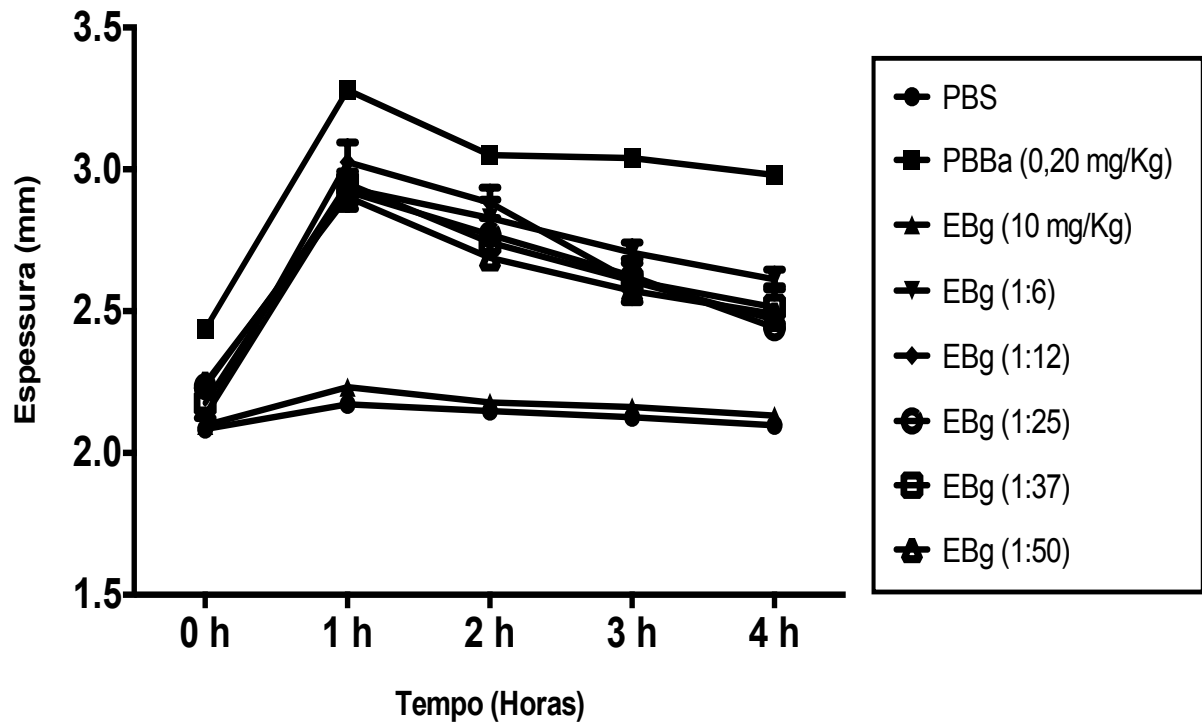
### 5.1.2 Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha da *B. atrox*

Para a avaliação do efeito do EBg sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha de *B. atrox*, diferentes concentrações do extrato (1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg/ 25  $\mu$ L PBS) foram misturados com 2 DEM (0,20 mg PBBa/25  $\mu$ L PBS) da referida peçonha.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Turkey, mostraram que não houve diferença estatisticamente significante entre os animais do grupo PBBa e os animais dos grupos administrados com o EBg, portanto, o extrato não foi capaz de inibir o edema de pata nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas, após a administração da peçonha, por via intradérmica (Figura 7).

Quando o extrato foi administrado isoladamente (10.0 mg/Kg/ 50  $\mu$ L PBS) nos animais do grupo controle PBBa, não houve indução de edema, nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas, quando comparado aos animais do grupo PBS.





**Figura 7** – Efeito do EBg sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha de *B. atrox*.

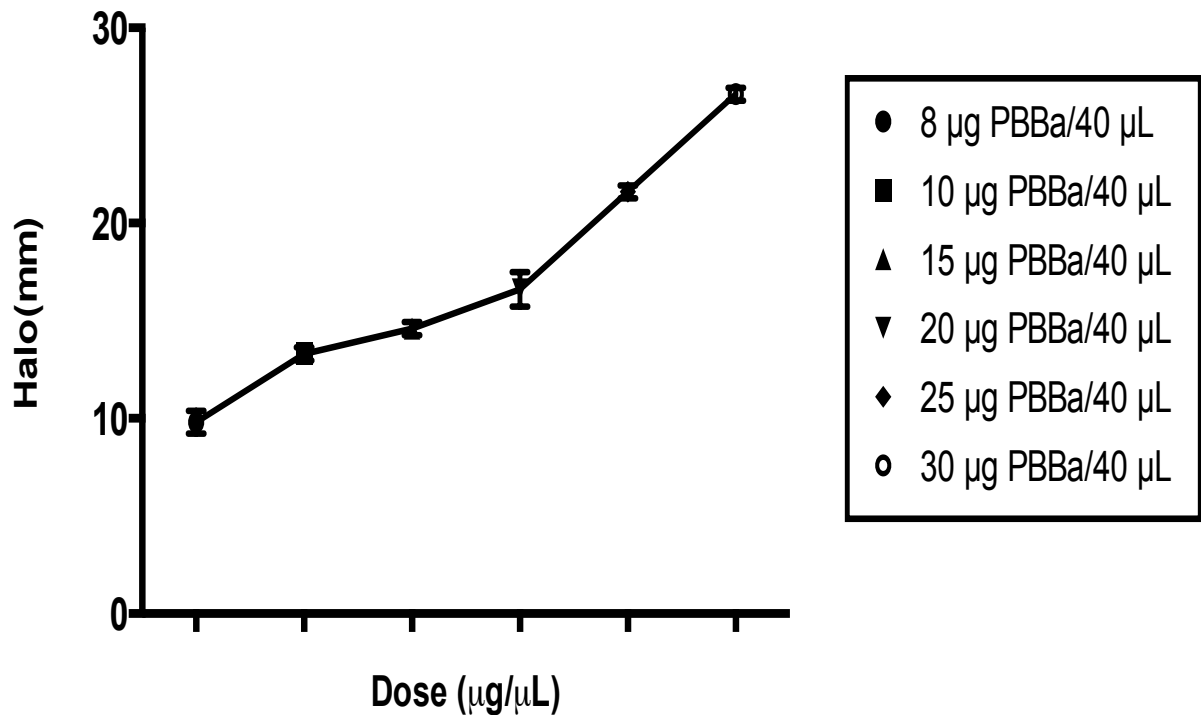
Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50  $\mu$ l PBS; PBBa= 0,20 mg/Kg/50 $\mu$ l PBS; EBg= 10 mg/Kg/50 $\mu$ l PBS; EBg (1:6) = 0,20 mg PBBa/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 1,25 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:12)= 0,20 mg PBBa/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 2,50 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:25)= 0,20 mg PBBa/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 5,0 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:37)= 0,20 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 7,25 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:50)= 0,20 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 10 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS. N= 5. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão.

## 5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA POR FOSFOLIPASES

A<sub>2</sub>

### 5.2.1. Determinação da dose hemolítica indireta mínima (DHeM) induzida pela peçonha de *B. atrox*

Para a determinação da DHeM, diferentes concentrações da peçonha (8; 10; 15; 20; 25; ou 30  $\mu$ g PBBa/40 $\mu$ L PBS) foram inoculadas em meio de cultura. Após a incubação dos meios de cultura a 37°C por 12 horas, os diâmetros dos halos formados foram medidos em milímetros. A DheM selecionada foi a concentração de 10  $\mu$ g PBBa/40 $\mu$ L PBS, responsável pela formação de um halo com 10 mm de diâmetro no meio de cultura (Figura 8).



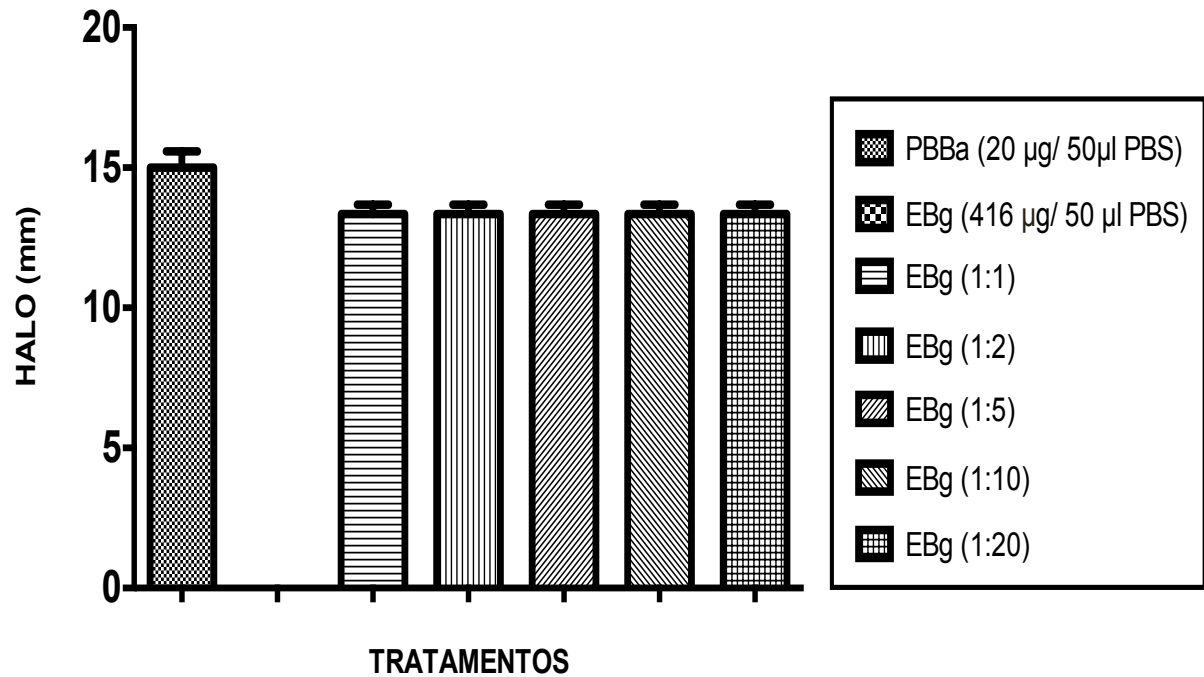
**Figura 8** – Determinação da dose hemolítica indireta por Fosfolipase A<sub>2</sub> (DHeM) induzida pela peçonha de *B. atrox*, incubada nos meios reacional a 37C° por 12 horas.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: 8 µg PBBa/40µL PBS; 10 µg PBBa/40µL PBS; 15 µg PBBa/40µL PBS; 20 µg PBBa/40µL PBS; 25 µg PBBa/40µL PBS; 30 µg PBBa/40µL PBS. N=3. Cada valor representa a média ± erro padrão.

### 5.2.2. Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade hemolítica indireta por Fosfolipases A<sub>2</sub> induzida pela peçonha *B. atrox*

Para os testes de inibição com o extrato, diferentes concentrações do EBg (26; 52; 104; 208; 416µg/ 25µL PBS) foram misturados com 2 DHeM da peçonha (20µg PBBa/ 25 µL PBS) e imediatamente inoculados no meio de cultura para avaliação da atividade hemolítica indireta por Fosfolipases A<sub>2</sub>.

Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos efetuados com EBg e o grupo PBBa (20 µg PBBa/ 50µL PBS), não havendo a inibição da atividade hemolítica indireta por Fosfolipases A<sub>2</sub> induzida pela peçonha de *B. atrox* (Figura 9). Também foi observado que o EBg (416 µg PBBa/ 50µL PBS) quando inoculado isoladamente, não induziu a formação de halo.



**Figura 9** – Efeito do EBg sobre a sobre a atividade hemolítica indireta por fosfolipases  $A_2$  da peçonha de *B. atrox*, incubado nos meios de cultura a 37 C° por 12 horas.

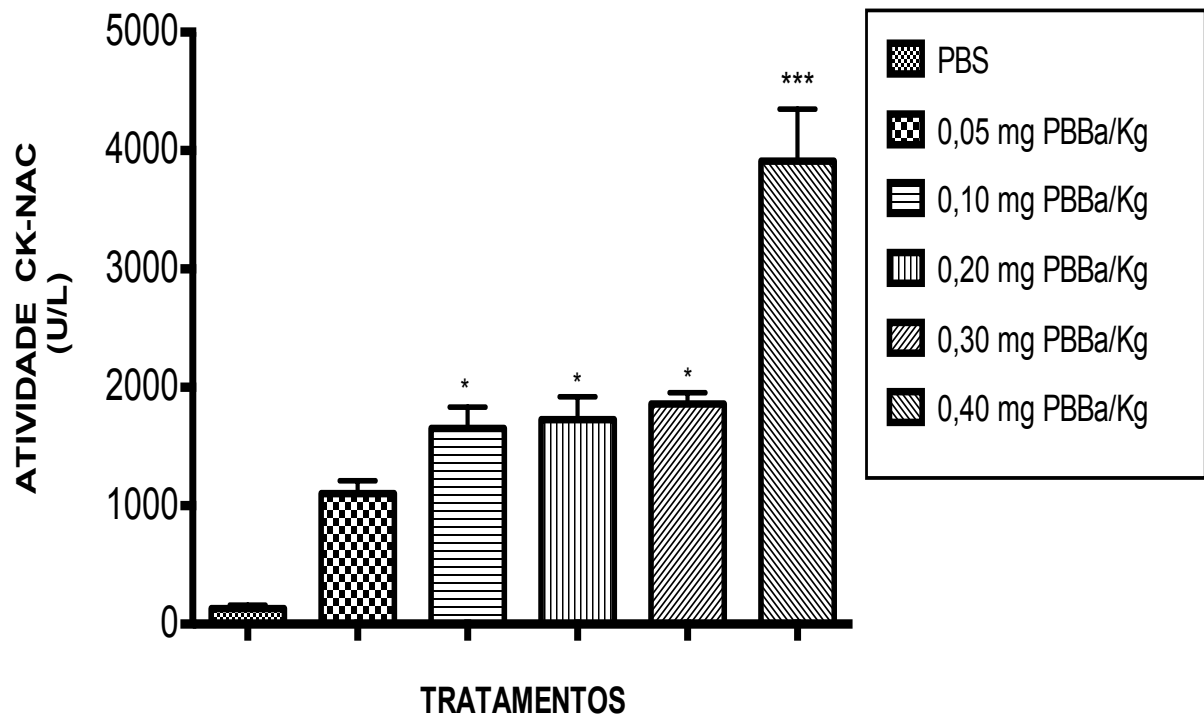
Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBBa= 20 µg/ 50 µl PBS; EBg= 416 µg/ 50 µl PBS; EBg (1:1)= 20 µg PBBa/ 25 µl PBS + Extrato= 26 µg / 25µL PBS; EBg (1:2) 20 µg PBBa/25µl PBS + Extrato= 52 µg/25µL PBS; EBg (1:5)= 20 µg PBBa/25µl PBS + Extrato=104 µg/25µL PBS; EBg (1:10)= 20 µg PBBa/25 µl PBS + Extrato= 208 µg/25µL PBS; EBg (1:20)= 20 µg PBBa/25 µl PBS + Extrato= 416µg/25µL PBS. N=3. Cada valor representa a média ± erro padrão.

### 5.3 ATIVIDADE MIOTÓXICA

#### 5.3.1 Determinação da dose miotóxica mínima (DMM) induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos após a administração de diferentes concentrações de peçonha de *B. atrox* (0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 mg PBBa/Kg/ 50 µL) em camundongos, por via i.m.

Após análise estatística dos resultados, selecionou-se a dose de 0,10 mg/Kg/50µL para os experimentos com o EBg, pois os resultados obtidos mostraram que houve uma elevação do níveis de creatina quinase ( $p < 0.05$ ), porém, sem produzir um efeito máximo na liberação desta enzima.

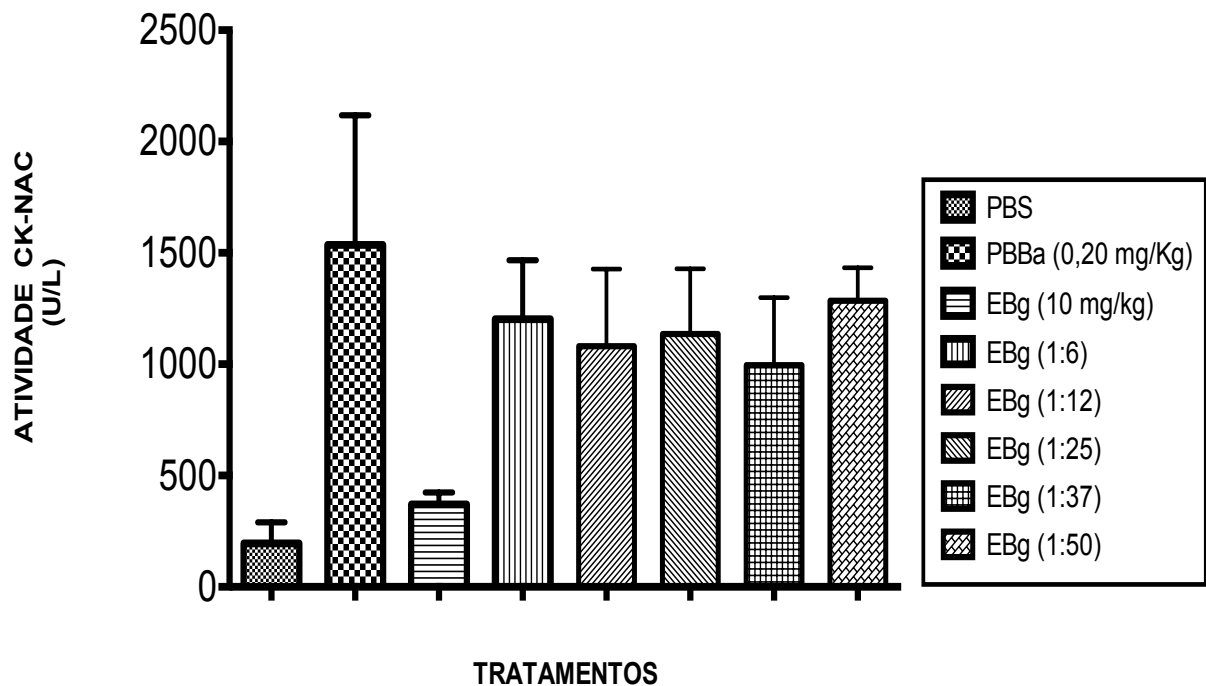


**Figura 10** – Determinação da dose miotóxica mínima (DMM) induzida pela peçonha de *B. atrox*

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50 $\mu$ L PBS; 0,05 mg PBBa/Kg/50  $\mu$ L PBS; 0,10 mg PBBa/Kg/50  $\mu$ L PBS; 0,20 mg PBBa/Kg/50 $\mu$ L PBS; 0,30 mg PBBa/Kg/50 $\mu$ L PBS; 0,40 mg PBBa/Kg/50 $\mu$ L PBS. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão. N= 5. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer).

### 5.3.2 Avaliação da eficácia do EBg sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Para a avaliação do efeito do EBg sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de *B. atrox*, diferentes concentrações do extrato (1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg/ 25  $\mu$ L PBS) foram misturados com 2 DMM (0,20 mg /25  $\mu$ L PBS) da referida peçonha. Os resultados da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Turkey (Figura 11), mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais do grupo controle PBBa e os animais dos grupos administrados com as diferentes concentrações de EBg.



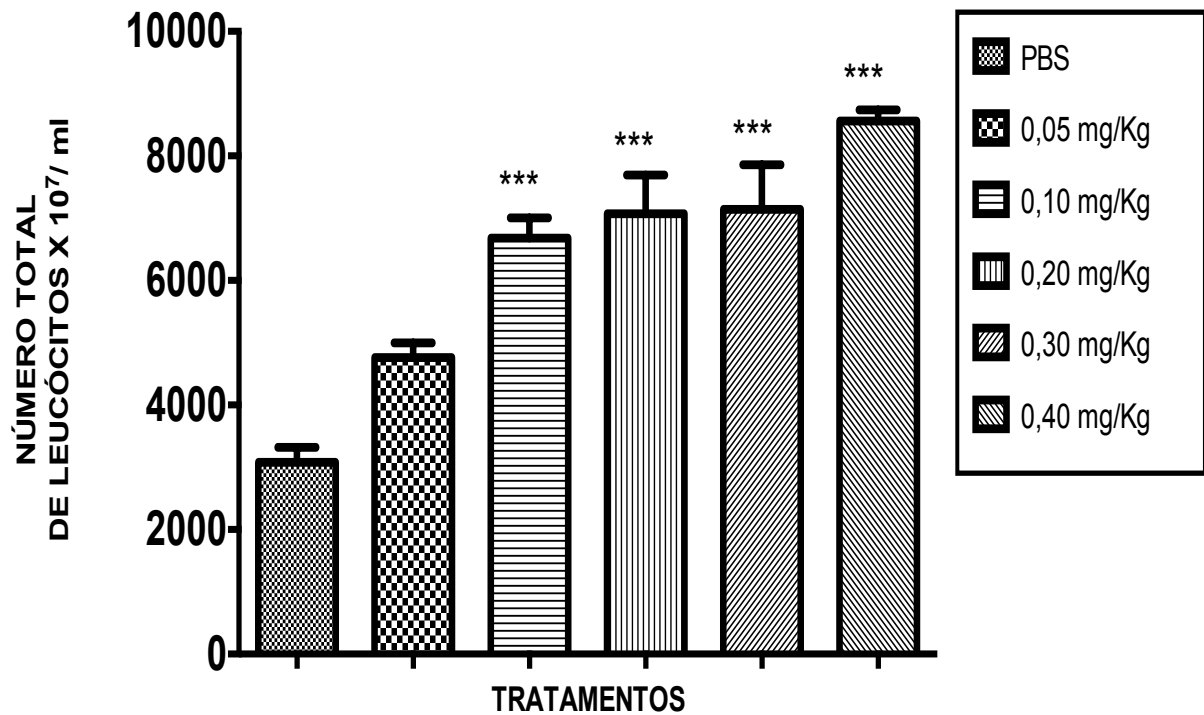
**Figura 11** – Efeito do EBg sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de *B. atrox*.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBBa= 0,20 mg/Kg/50µl PBS; EBg= 10 mg/Kg/50µl PBS; EBg (1:6)= 0,20 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato 1,25 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:12)= 0,20 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato 2,50 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:25)= 0,20 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato 5,0 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:37)= 0,20 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato 7,25 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:50)= 0,20 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato 10 mg/Kg/25µl PBS. N= 5. Cada valor representa a média ± erro padrão.

## 5.4 ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

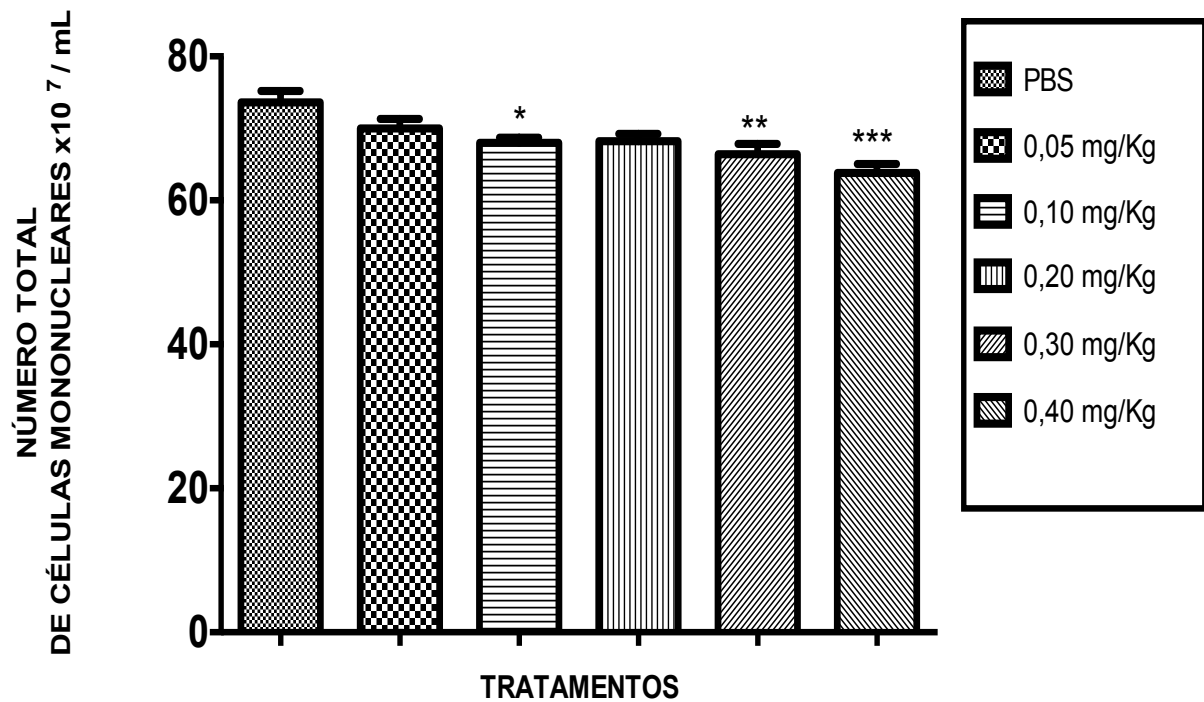
### 5.4.1 Determinação da dose inflamatória mínima (DIM) do veneno de *Bothrops atrox*.

Para determinação da dose inflamatória mínima foram utilizadas diferentes concentrações de peçonha (0,05; 0,10 ;0,20 ; 0,30 ; 0,40 mg/Kg/ 50 µL PBS) administradas por via i.p. em camundongos. Os resultados mostraram que houve uma acentuada resposta inflamatória aguda produzida na cavidade peritoneal dos animais utilizados, (Figura 12) revelando uma diminuição do número de células mononucleares (Figura 13) e o aumento da migração de células polimorfonucleares (Figura 14).



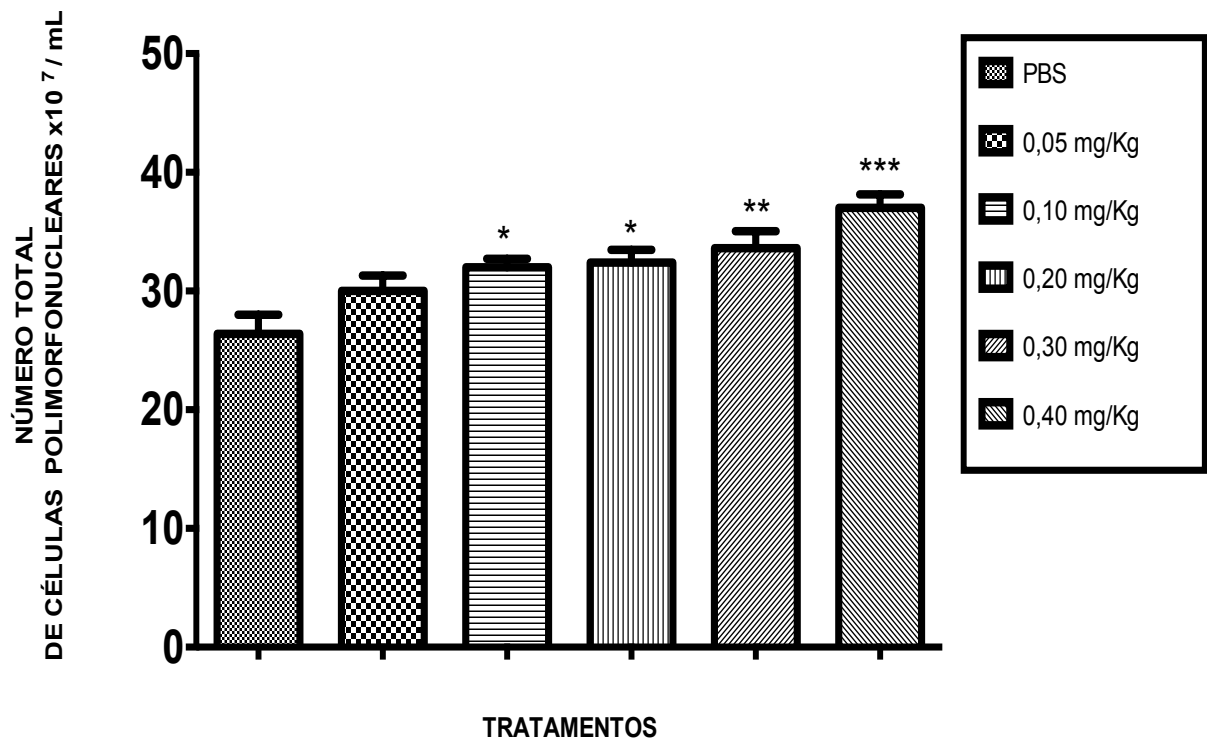
**Figura 12** – Efeito da administração de PBBa sobre migração celular para a cavidade peritoneal de camundongos.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,05 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,10 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,20 mg PBBa/Kg/50µL; 0,30 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,40 mg PBBa/Kg/50 µL PBS. N= 5. Cada valor representa a média ± erro padrão. \*\*\* p<0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o grupo PBS.



**Figura 13** – Efeito da administração de PBBa sobre a migração de células mononucleares para cavidade peritoneal de camundongos.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,05 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,10 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,20 mg PBBa/Kg/50µL; 0,30 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,40 mg PBBa/Kg/50 µL PBS. N= 5. \*p<0,05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o grupo PBS. Cada valor representa a média ± erro padrão.



**Figura 14** – Efeito da administração de PBBA sobre a migração de células polimorfonucleares para cavidade peritoneal de camundongos

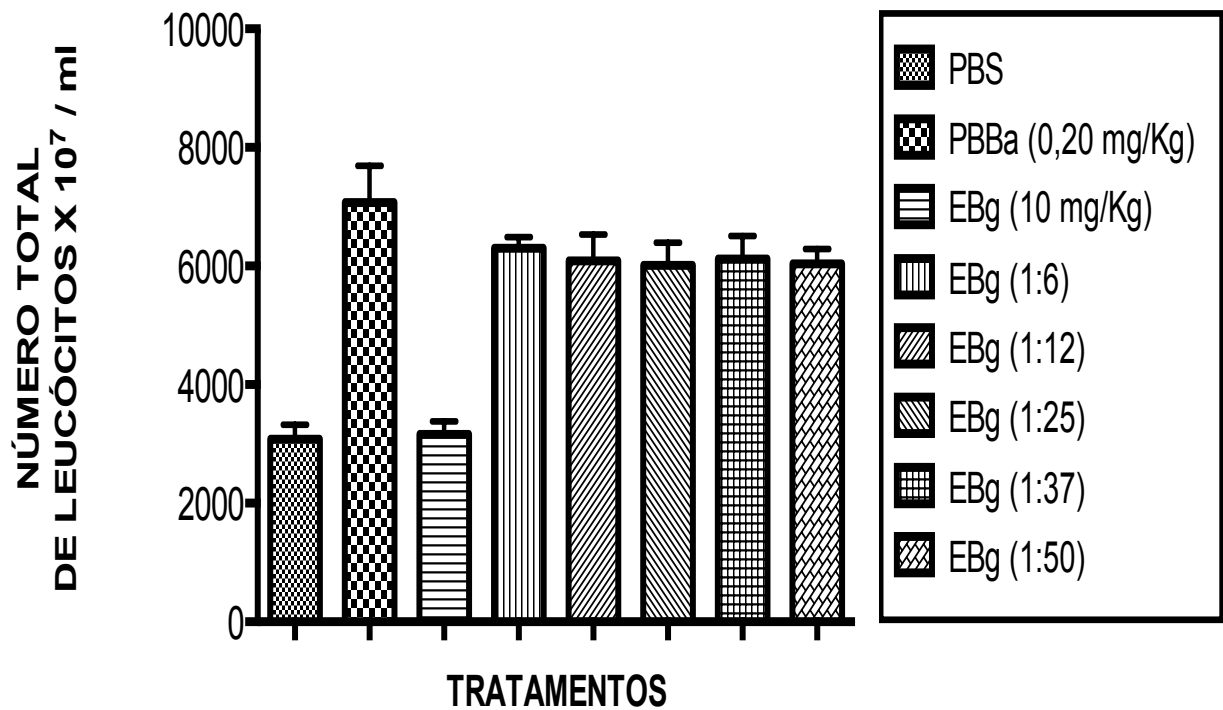
Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor.. Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,05 mg PBBA/Kg/50 µL PBS; 0,10 mg PBBA/Kg/50 µL PBS; 0,20 mg PBBA/Kg/50µL; 0,30 mg PBBA/Kg/50 µL PBS; 0,40 mg PBBA/Kg/50 µL PBS. N= 5. \*p<0,05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o grupo PBS. Cada valor representa a média ± erro padrão

#### 5.4.2 Avaliação da eficácia do EBg sobre a atividade inflamatória induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Para a avaliação do efeito do extrato sobre a atividade inflamatória, diferentes concentrações do extrato (1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg/ 25 µL PBS) foram misturados com 2 DIM (0,20 mg PBBA/25 µL PBS) da peçonha de *B. atrox* e imediatamente administrados por via i.p.

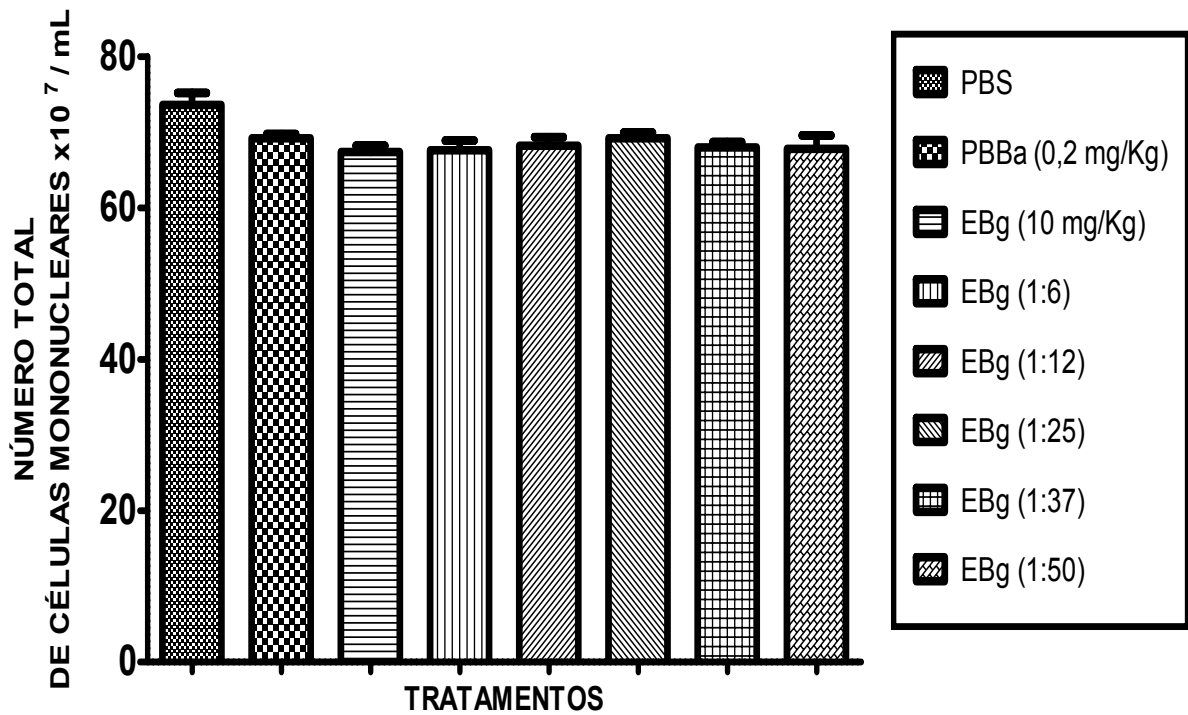
Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre resposta inflamatória aguda induzida nos animais do grupo PBBA e a resposta observada nos animais dos grupos administrados com o EBg (Figura 15), pois não foram observadas alterações significativas na contagem total de leucócitos (Figura 15) e no número de células monucleares (Figura 16) e polimorfonucleares (Figura 17) quando comparadas às respostas apresentadas pelos animais do grupo controle PBBA.





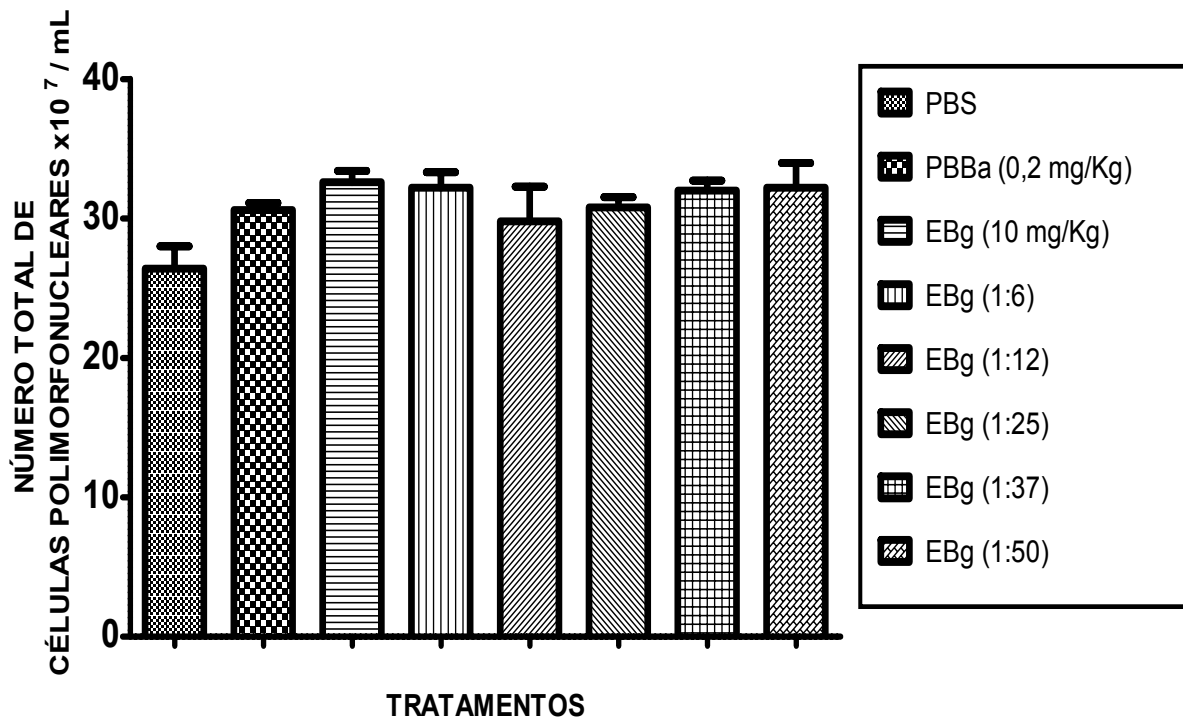
**Figura 15** – Efeito do EBg sobre a migração celular induzido pela peçonha de *B. atrox*.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBBa= 0,20 mg/Kg/50µl PBS; EBg= 10 mg/Kg/50µl PBS; EBg (1:6)= 0,20 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato= 1,25 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:12)= 0,20 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato= 2,50 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:25)= 0,2 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato= 5,0 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:37)= 0,2 mg/Kg/25µl PBS + Extrato= 7,25 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:50)= 0,2 mg/Kg/25µl PBS + Extrato 10 mg/Kg/25µl PBS. N= 5. Cada valor representa a média ± erro padrão.



**Figura 16** - Efeito do EBg sobre a migração de células mononucleares induzido pela peçonha de *B. atrox*.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBBa= 0,2 mg/Kg/50µl PBS; EBg (10 mg/Kg/50µl PBS); EBg (1:6)= 0,2 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato= 1,25 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:12)= 0,2 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato= 2,50 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:25)= 0,2 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato= 5,0 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:37)= 0,2 mg/Kg/25µl PBS + Extrato= 7,25 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:50)= 0,2 mg/Kg/25µl PBS + Extrato 10 mg/Kg/25µl PBS. N= 5. Cada valor representa a média ± erro padrão.



**Figura 17** - Efeito do EBg sobre a migração de células polimorfonucleares induzido pela peçonha de *B. atrox*.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBBa= 0,20 mg/Kg/50µl PBS; EBg= 10 mg/Kg/50µl PBS; EBg (1:6) = 0,20 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato= 1,25 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:12)= 0,20 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato= 2,50 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:25)= 0,20 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato= 5,0 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:37)= 0,20 mg/Kg/25µl PBS + Extrato= 7,25 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:50)= 0,20 mg/Kg/25µl PBS + Extrato 10 mg/Kg/25µl PBS. N= 5. Cada valor representa a média ± erro padrão.

## 5.5 ATIVIDADE NOCICEPTIVA

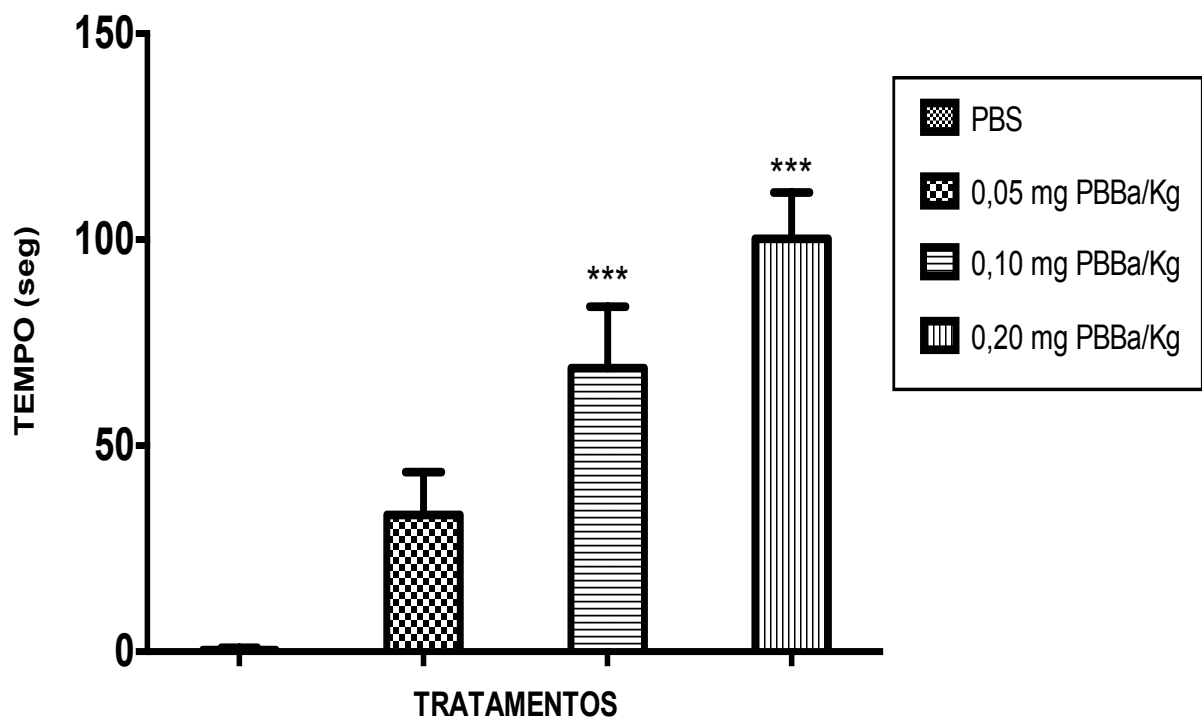
### 5.5.1 Determinação da dose nociceptiva mínima (DNM) induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

O procedimento usado para a indução da dor de mediação central e periférica foi uma adaptação do método de Hunskaar et al. (1985), realizado por Souza et al. (2012), onde diferentes concentrações (0,05; 0,10; 0,20 mg/Kg) de peçonha foram administradas por via subcutânea na pata posterior direita de camundongos.

A atividade nociceptiva foi avaliada em 2 intervalos de tempo, sendo o primeiro de 0 a 5 minutos (Figura 18 A) e o segundo de 20 a 30 minutos (Figura 18 B) após a administração de peçonha.

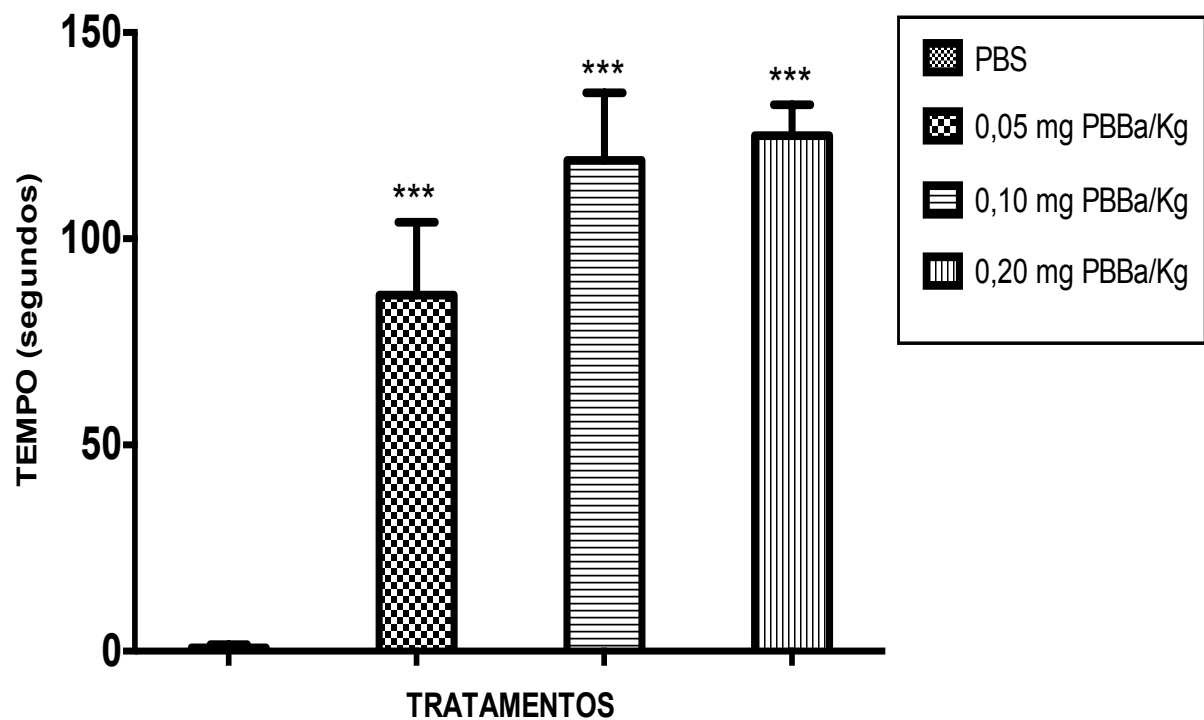
Os resultados obtidos mostram que na primeira fase da atividade nociceptiva, somente os grupos 0,10 mg/Kg e 0,20 mg/Kg mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle (Figura 18A).

Na segunda fase (Figura 18B), os animais dos grupos tratados com 0,05 mg/Kg, 0,10 mg/Kg ou 0,20 mg/Kg apresentaram diferença estatisticamente significativamente. Após a análise dos resultados obtidos, verificou-se que a concentração de 0,10 mg PBBa/Kg, foi a menor dose capaz de induzir a nocicepção nos dois intervalos de tempo avaliados.



**Figura 18A** – Dose nociceptiva mínima (DNM) induzida pela peçonha da serpente *B. atrox* – intervalo de 0-5 minutos.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,05 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,10 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,20 mg PBBa/Kg/50µL PBS. N= 5. Cada valor representa a média ± erro padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer).



**Figura 18B** – Dose nociceptiva mínima (DNM) da peçonha da serpente *B. atrox* – intervalo de 20-30 minutos.

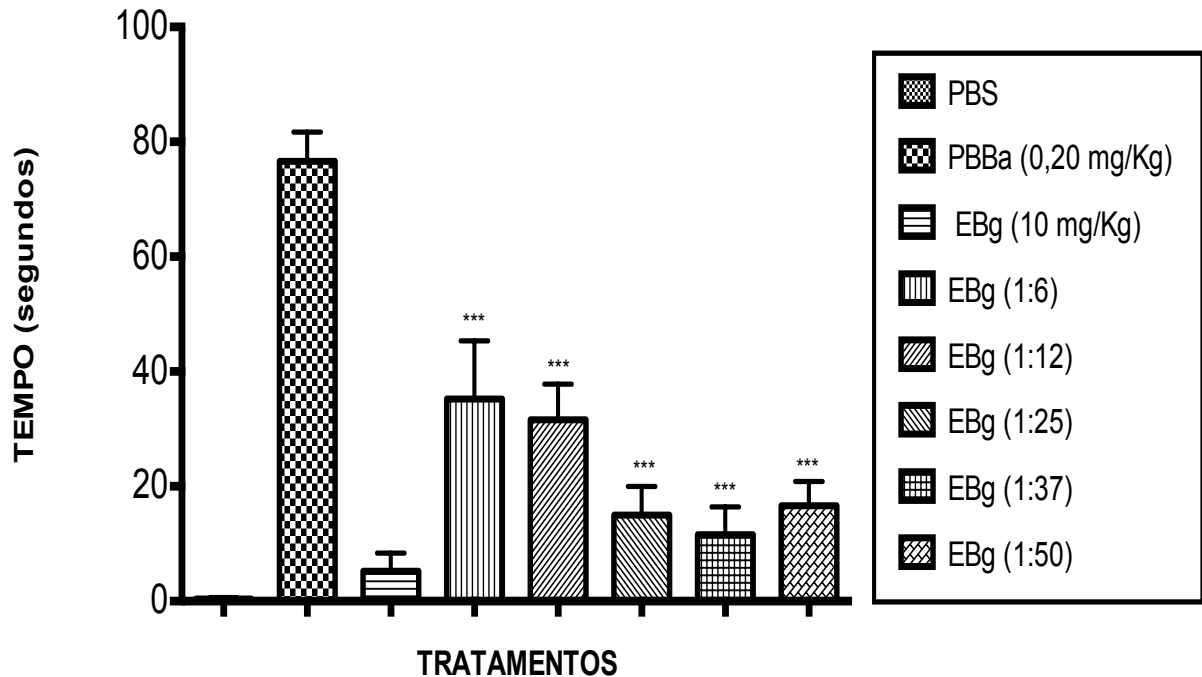
Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50 $\mu$ L PBS; 0,05 mg PBBa/Kg/50  $\mu$ L PBS; 0,10 mg PBBa/Kg/50  $\mu$ L PBS; 0,20 mg PBBa/Kg/50 $\mu$ L PBS. N= 5. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão. \*\*\* p<0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer).

### 5.5.1 Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade nociceptiva induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

Para a avaliação do efeito do EBg sobre a atividade nociceptiva, diferentes concentrações de extratos (1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg/ 25  $\mu$ L PBS) foram misturados com 2 DNM (0,20 mg/ 25  $\mu$ L PBS) da peçonha de *B. atrox* e imediatamente administrados por via s.c.

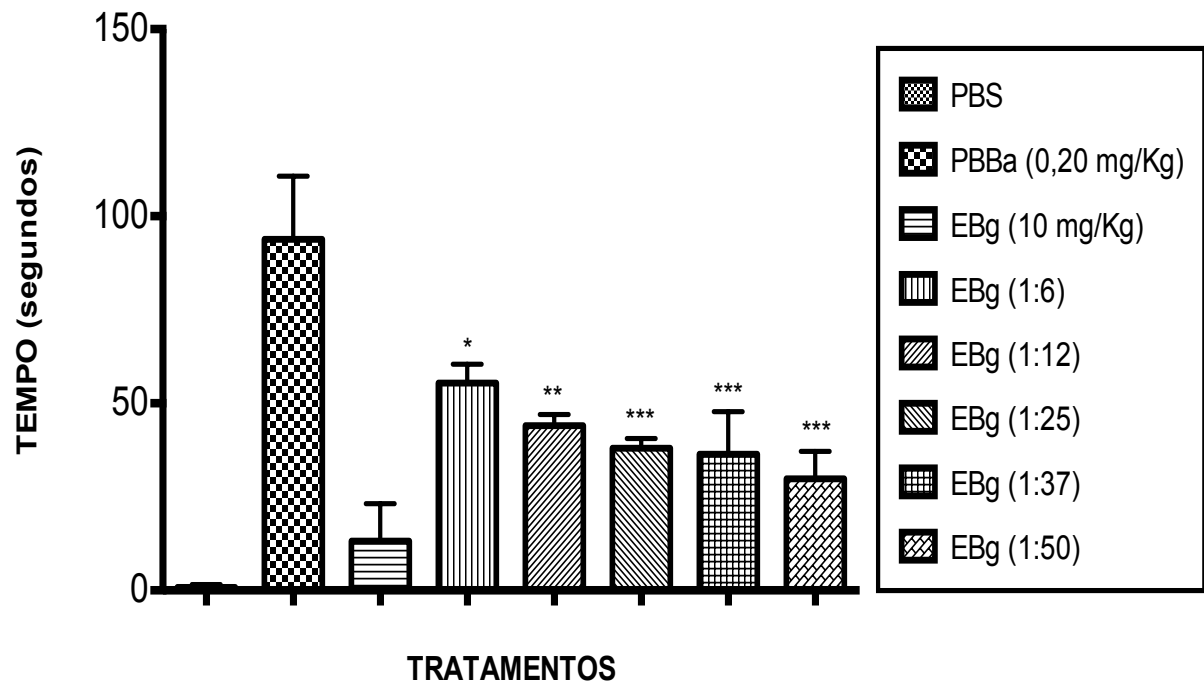
Os resultados obtidos (Figura 19 A) mostraram uma redução na resposta nociceptiva induzida pela peçonha nos dois intervalos de tempo avaliados, porém os animais tratados com EBg (1:6; 1:12; 1:25; 1:37; 1:50) apresentaram uma redução mais acentuada da nocicepção no período de 0 a 5 minutos (35,20  $\pm$  10,15, p<0,001; 31,60  $\pm$  6,218, p<0,001; 15,00  $\pm$  4,980, p<0,001; 11,60  $\pm$  4,844, p<0,001; 16,60  $\pm$  4,261, p<0,001, respectivamente) quando comparado com o grupo PBBa (76,60  $\pm$  5,085).

A figura 19 B mostra os resultados das respostas de nocicepção no período de 20 a 30 minutos ( $55,40 \pm 5,036$ ,  $p < 0,05$ ;  $44,00 \pm 3,017$ ,  $p < 0,01$ ;  $38,00 \pm 2,608$ ,  $p < 0,001$ ;  $36,40 \pm 11,36$ ,  $p < 0,001$ ;  $29,80 \pm 7,378$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente) quando comparado com o grupo PBBa ( $93,80 \pm 16,90$ )



**Figura 19 A** – Efeito do EBg sobre a primeira fase da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de *B. atrox* - intervalo de 0-5 minutos..

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50  $\mu$ l PBS; PBBa= 0,20 mg/Kg/50 $\mu$ l PBS; EBg= 10 mg/Kg/50 $\mu$ l PBS; EBg (1:6)= 0,20 mg PBBa/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 1,25 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:12)= 0,20 mg PBBa/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 2,50 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:25)= 0,2 mg PBBa/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 5,0 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:37)= 0,20 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 7,25 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:50)= 0,20 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 10 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS. As respostas foram mensuradas 0-5 min após administração. N= 5. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o PBBa.



**Figura 19 B** – Efeito do EBg sobre a segunda fase da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de *B. atrox* - intervalo de 20-30 minutos.

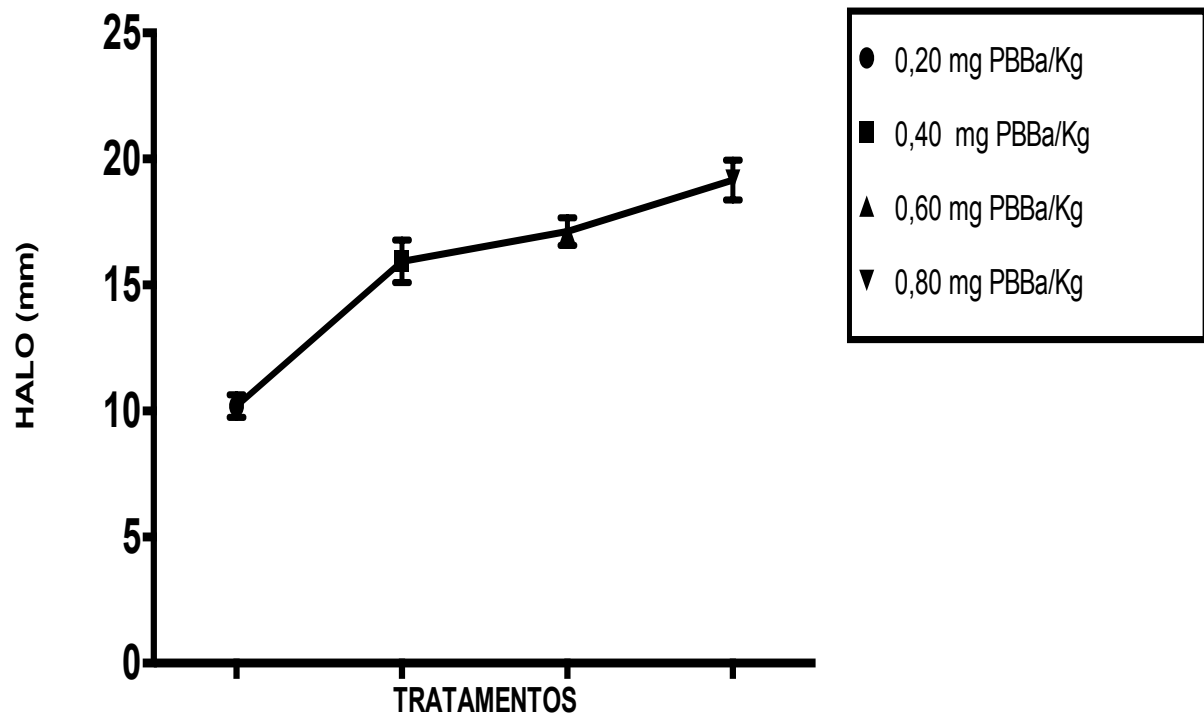
Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50  $\mu$ l PBS; PBBa= 0,20 mg/Kg/50 $\mu$ l PBS; EBg= 10 mg/Kg/50 $\mu$ l PBS; EBg (1:6)= 0,20 mg PBBa/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 1,25 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:12)= 0,20 mg PBBa/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 2,50 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:25)= 0,20 mg PBBa/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 5,0 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:37)= 0,20 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 7,25 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS; EBg (1:50)= 0,20 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS + Extrato= 10 mg/Kg/25 $\mu$ l PBS. As respostas foram mensuradas 20-30min (Segunda Fase) após administração. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão. N=5. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 \*\*\*  $p$ <0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o PBBa.

## 5.6 ATIVIDADE HEMORRÁGICA

### 5.6.1. Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Na determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) da peçonha da serpente *Bothrops atrox*, os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 5 animais cada, aos quais foram administrados doses crescentes de peçonha (0,20; 0,40; 0,60; 0,80 mg/Kg/50  $\mu$ L PBS), por via i.d. Após 2 horas, os halos hemorrágicos foram medidos em mm.

A figura 15 mostra os valores após a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Turkey, selecionou-se a dose 0,20 mg PBBa/Kg/ 50 µL PBS, pois essa foi a dose capaz de induzir um halo hemorrágico de 10 mm (Figura 20).



**Figura 20** – Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) da induzida pela peçonha de *B. atrox*.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: 0,20 mg PBBa/Kg/50µl PBS; 0,40 mg PBBa/Kg/50µl PBS; 0,60 mg PBBa/Kg/50µl PBS; 0,80 mg PBBa/Kg/50µl PBS. PBBa (Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*). N=5. Cada valor representa a média ± erro padrão.

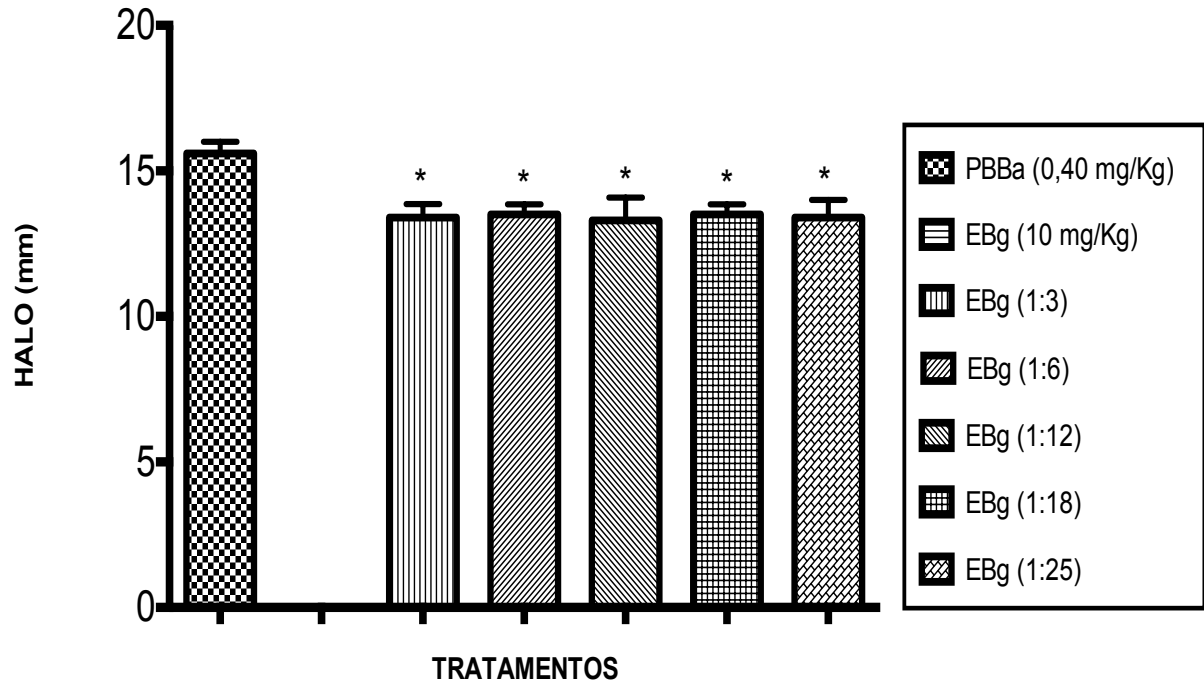
### 5.6.2 Avaliação do efeito EBg sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Para a avaliação do efeito do EBg sobre a hemorragia induzida pela peçonha, diferentes concentrações do extrato (1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg/ 25 µL PBS) foram misturadas com 2 DHM (0,40 mg/Kg/25 µL) de peçonha, e imediatamente após foram injetados 50 µL desta mistura no dorso dos animais (Figura 21).

Os resultados obtidos após a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Turkey, demonstraram que os animais dos grupos tratados com o EBg (1:3;



1:6; 1:12; 1:18; 1:25) apresentaram redução do halo hemorrágico ( $13,40 \pm 0,4583$ ,  $p < 0,05$ ;  $13,50 \pm 0,3536$ ,  $p < 0,05$ ;  $13,30 \pm 0,7842$ ,  $p < 0,05$ ;  $13,40 \pm 0,3536$ ,  $p < 0,05$ ) quando comparados aos animais do grupo PBBa ( $15,60 \pm 0,4000$ ).



**Figura 21** – Efeito do EBg sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. atrox*.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBBa= 0,40 mg/Kg/50µl PBS; EBg= 10 mg/Kg/50µl PBS; EBg (1:3)= 0,40 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato 1,25 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:6)= 0,40 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato 2,50 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:12)= 0,40 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato 5,0 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:18)= 0,40 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato 7,25 mg/Kg/25µl PBS; EBg (1:25)= 0,40 mg PBBa/Kg/25µl PBS + Extrato 10 mg/Kg/25µl PBS. PBBa (Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*). N= 5. Cada valor representa a média ± erro padrão. \* $p < 0,05$  (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados ao grupo PBBa.

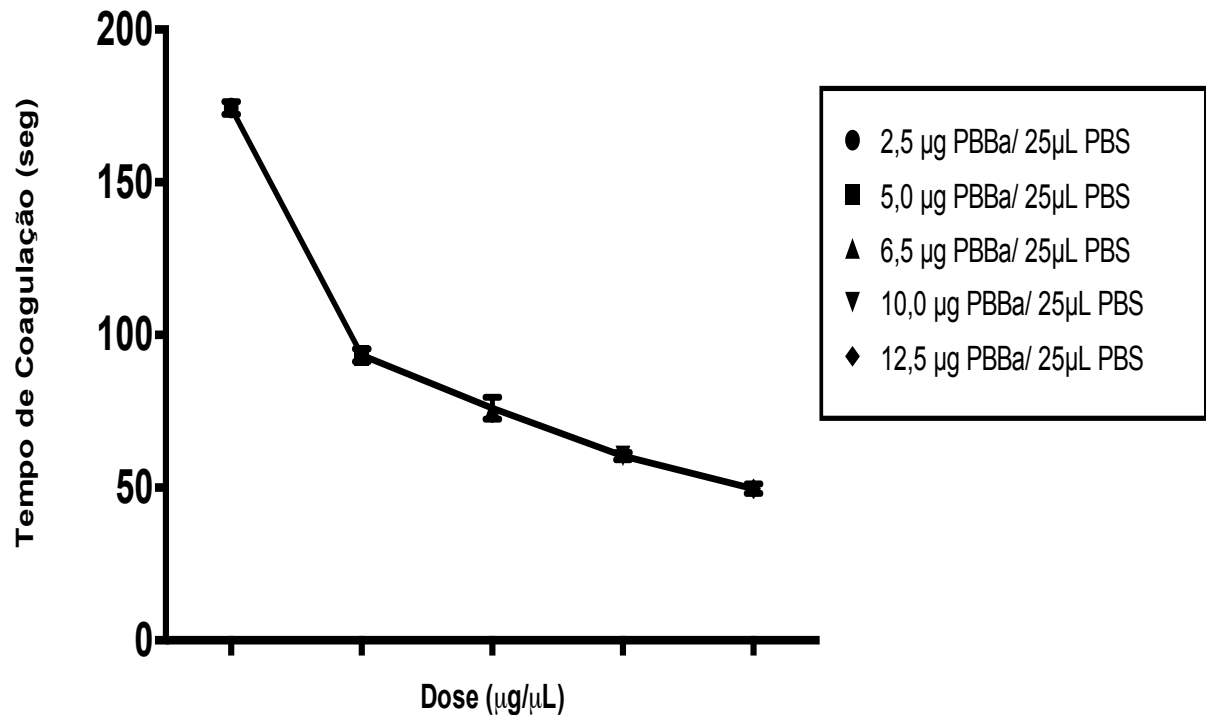
## 5.7 ATIVIDADE COAGULANTE

### 5.7.1 Determinação da dose coagulante mínima (DCM) induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

A Figura 22 apresenta os resultados da atividade coagulante observados após incubação da peçonha (2,5; 5,0; 6,5; 10,0; 12,5 µg/25 µL PBS) com o plasma humano a 37°C. Os resultados foram representados em um gráfico com as variáveis Tempo de Coagulação x Dose (µg).

A dose coagulante mínima é definida como a menor concentração de peçonha capaz de induzir a formação de coágulo no plasma contendo citrato de sódio, em 60 segundos, a 37°C.

Após análise dos resultados, verificou-se que a concentração de 10 µg/ 50 µL PBS promoveu a coagulação do plasma humano no tempo citado, sendo portanto, considerada como a dose coagulante mínima.



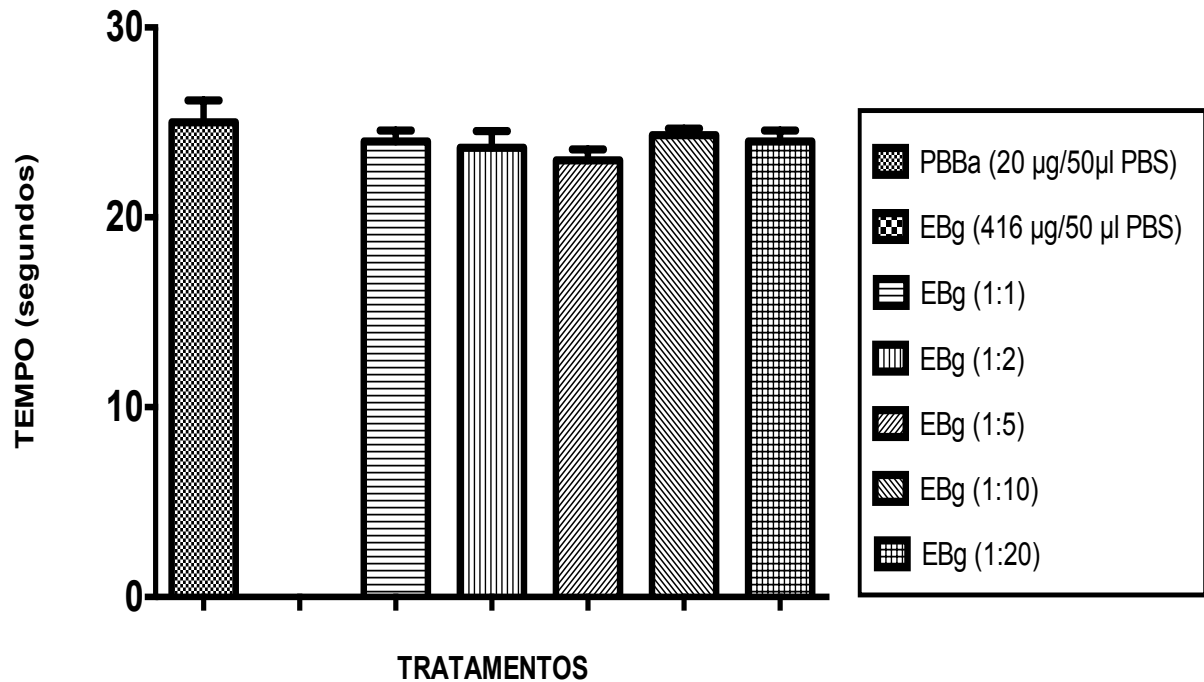
**Figura 22** – Efeito da PBBa sobre o tempo de coagulação sanguínea em plasma humano a 37°C.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: 2,5µg PBBa/25µL PBS; 5,0µg/25µL PBS; = 6,5µg/ 25µL PBS; 10,0µg/25µL PBS; 12,5µg/25µL PBS. N=3. (Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média ± erro padrão

### 5.7.2 Avaliação do efeito do EBg sobre a atividade coagulante induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Para avaliar o efeito do EBg sobre a atividade coagulante, diferentes concentrações de extrato (26; 52; 104; 208; 416µg/ 25µL PBS) foram misturadas com 2 DCM da peçonha (20 µg PBBa/ 25 µL PBS) e imediatamente após adicionados a 200 µL de plasma contendo citrato de sódio, sendo incubados em banho maria a 37°C.

Os resultados obtidos (Figura 23) mostraram que o EBg, nas concentrações utilizadas no presente estudo, não foram capazes de neutralizar a atividade coagulante induzida pela peçonha de *B. atrox*, em plasma humano contendo citrato de sódio.



**Figura 23** – Efeito do EBg sobre o tempo de coagulação sanguínea em plasma humano a 37°C.

Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Tratamentos: PBBa= 20 µg/ 50 µl PBS; EBg= 416 µg/ 50 µl PBS; EBg (1:1)= 20 µg PBBa/ 25 µl PBS + Extrato= 26 µg / 25µL PBS; EBg (1:2) 20 µg PBBa/25µl PBS + Extrato= 52 µg/25µL PBS; EBg (1:5)= 20 µg PBBa/25µl PBS + Extrato=104 µg/25µL PBS; EBg (1:10)= 20 µg PBBa/25 µl PBS + Extrato= 208 µg/25µL PBS; EBg (1:20)= 20 µg PBBa/25 µl PBS + Extrato= 416µg/25µL PBS. N=3. Cada valor representa a média ± erro padrão.

## 6 DISCUSSÃO

Os envenenamentos ocasionados por serpentes de interesse médico representam um grave problema de saúde pública no Brasil e em diversos outros países.

A OMS incluiu este agravo na lista de Doença Tropical Negligenciada (DTN) no ano de 2009, por se tratar de um problema de saúde já erradicado ou praticamente erradicado nos países desenvolvidos mas, que ocorrem com frequência em países em desenvolvimento e/ou subdesenvolvidos (WILLIAMS et al., 2010).

Segundo estimativas, os envenenamentos provocados por serpentes peçonhentas causam de 20.000 a 125.000 óbitos por ano e quando comparados com os óbitos causados por outras DTN como, por exemplo, a Dengue (19.000 mil óbitos), Doença de Chagas (14.000 mil óbitos) e Leishmaniose (51.000 mil óbitos) apresentam a maior taxa de mortalidade (WILLIAMS et al., 2010).

Mais de um século após o início da soroterapia, a mesma continua sendo a única opção terapêutica preconizada pela OMS e Ministério da Saúde. Porém, ainda não é capaz de neutralizar eficazmente os efeitos locais provocados por este tipo de acidente, o que pode ocasionar sequelas permanentes (ZYCHAR, et al., 2008; MOREIRA et al., 2012).

PICOLO et al. (2002), demonstraram que a neutralização do edema e dor induzidos pela peçonha de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*, só ocorre quando o soro é administrado antes do envenenamento, o que acaba por não refletir a realidade terapêutica. Além disso, esse estudo demonstra a ineficácia do soro na neutralização do edema e dor, quando o tratamento ocorre após a indução desses efeitos.

Da Silva et al. (2007) mostraram que os soros antibotrópicos produzidos no Brasil não foram capazes de neutralizar eficazmente a atividade miotóxica induzida pelas peçonhas de *B. jararaca* e *B. jararacussu*. Resultados satisfatórios somente foram obtidos com doses elevadas do soro, estando em desacordo com os protocolos de tratamento instituídos pelo Ministério da Saúde.

O uso de doses terapêuticas elevadas e também de soro antiofídico podem ocasionar o surgimento de efeitos indesejáveis como, reações anafiláticas e

hipersensibilidade às proteínas heterólogas constituído por imunoglobulinas purificadas de outro animal, o cavalo (PICOLO et al., 2002; DA SILVA et al., 2007; MOURA et al., 2011).

Como a produção do soro é extremamente onerosa e, conseqüentemente, pouco rentável, a sua produção acaba sendo menos atrativa, resultando em altas taxas de mortalidade na população afetada, principalmente nos países africanos e asiáticos (GUTIÉRREZ et al., 2012).

A maioria dos acidentes ocorrem em áreas rurais carentes de serviços de saúde e, conseqüentemente, a população dessas áreas recorrerem a tratamentos com o uso de plantas medicinais tornando necessário a validação científica dessas informações, a fim de garantir segurança e eficácia desse tratamento (MAIORANO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; SOARES et al., 2005).

Como as plantas medicinais são fontes de diversos compostos que apresentam propriedades farmacológicas, estudos que comprovem esses efeitos podem possibilitar o uso desses compostos na complementação da soroterapia (SOARES et al., 2005).

Em um levantamento realizado por Soares et al. (2005), observou-se que 82,5 % dos estudos realizados com plantas medicinais utilizadas no tratamento dos envenenamentos por serpentes peçonhentas ocorrem no continente americano, o que demonstra a potencialidade dos recursos naturais presentes em nossa região.

Os acidentes botrópicos induzem uma série de efeitos locais e sistêmicos, representados por dor, edema, podendo evoluir para sangramentos e necrose, e efeitos sistêmicos representados por sangramentos, coagulopatias e alterações cardiovasculares e renais.

Sendo a resposta inflamatória um dos principais sinais induzido pelo envenenamento botrópico, e se não controlado pode levar ao aparecimento da síndrome compartimental e/ou pode evoluir para necrose tecidual, ocasionando a perda de função da região afetada ou até mesmo a amputação do membro (FURTADO et al., 1991; DA COSTA et al., 2008; NUÑÉZ et al., 2009; MOREIRA et al., 2012). E Segundo Furtado et al. (1991), esse efeito é mais intenso nos acidentes ocasionados pela serpente *Bothrops atrox*.

Tendo em vista a grande diversidade de plantas medicinais encontradas na Região Amazônica, em especial, no Estado do Amapá, estudos como este

podem contribuir para a verificação dos efeitos que estes vegetais podem desencadear ao serem utilizados após um acidente ofídico.

Tal fato torna-se importante devido o amplo uso de plantas medicinais pela população em todo o mundo, principalmente em locais onde há carência em serviços de saúde, áreas de difícil acesso e/ou distantes de unidades que possuam atendimentos de saúde pública.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato aquoso da planta *Brosimum guianense* sobre as atividades edematogênica, hemolítica indireta por fosfolipases A<sub>2</sub>, miotoxicidade, inflamação, nocicepção, hemorragia e coagulação induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox*, considerando o fato da população no Estado do Amapá utilizar a mesma no tratamento do envenenamento ofídico.

Os resultados da avaliação do efeito do EBg sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha da *Bothrops atrox* mostraram que o extrato não foi capaz de inibir o edema de pata nos tempos de 1, 2, 3 e 4 h, após a administração da peçonha, por via intradérmica em camundongos.

Em estudo realizados por Maiorano et al. (2005), o extrato aquoso de *Mikania glomerata* não promoveu a redução do edema induzida pela peçonha de *Bothrops jararacussu*. Porém, esses extratos foram capazes de reduzir o edema induzido pela peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.

A extrato aquoso de *Mandevilla velutina* promoveu a inibição da atividade edematogênica induzida, pela peçonha e pelas toxinas isoladas de serpentes *Bothrops alternatus* e *Crotalus durissus terrificus* em estudos realizados por Biondo et al. (2003).

Strauch et al. (2013) demonstraram que o extrato etanólico bruto de *Humirianthera ampla*, e compostos isolados (sisterol e lupeol) dessa espécie, reduziram o edema induzido pela peçonha de *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu*.

Soares de Moura et al. (2002) demonstraram que a fração MG1, obtida através do fracionamento do extrato de *Mikania glomerata* inibiu o edema induzido pelo envenenamento de *Bothrops jararacussu*.

Outros estudos como o de Fonseca et al. (2004) observaram a redução do edema induzido por peçonha de *Bothrops alternatus*, em camundongos tratados com extrato aquoso de *K. brasiliensis*. Essa redução do edema também foi

observado com o extrato aquoso de *Arrabidaea chica* em estudo realizado por Oliveira et al. (2009).

Em relação a avaliação dos efeitos do EBg sobre a atividade hemolítica indireta por Fosfolipases  $A_2$  induzida pela peçonha de *B. atrox*, os resultados mostraram o extrato não foi eficaz na neutralização deste ensaio *in vitro*.

Kanashiro et al. (2002), observaram que as fosfolipases BaPLA<sub>2</sub>I e BaPLA<sub>2</sub>III presentes na peçonha de *B. atrox* são responsáveis pelo forte reação inflamatória desencadeada nesse tipo de acidente, e estão relacionadas a liberação da histamina decorrente da desgranulação dos mastócitos, além de promoverem a elevação dos níveis de creatina quinase.

Porém, em experimentos realizados por Maiorano et al (2005), os mesmos verificaram que os extratos da *Mikania glomerata* inibiram em 100% as fosfolipases da peçonha da serpente *C. durissus terrificus*, enquanto que o mesmo extrato só foi capaz de inibir 25 % das fosfolipases da peçonha de *B. jararacussu*.

Magalhães et al. (2011), demonstraram que os extratos das partes aéreas (folhas e inflorescência) de *Marsypianthes chamaedrys* foram mais eficazes na redução da atividade fosfolipásica do que o soro antiofídico (BAV).

A avaliação da atividade das fosfolipases é fundamental pois, as fosfolipases (PLA<sub>2</sub>) apresentam variações, exercendo diversas ações como miotóxicas, neurotóxicas, edematogênica, hipotensiva, agregantes plaquetárias, cardiotóxicas e anticoagulantes (TEIXEIRA et al., 2003).

A avaliação do efeito do EBg sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha de *B. atrox*, mostrou que extrato não inibiu a miotoxidade, pois não houve diminuição na liberação da enzima creatina quinase induzida após lesão muscular.

Mise et al. (2009) observaram a redução nos níveis de creatinina quinase (CK) e das lesões histopatológicas, demonstrando a ação protetora do extrato de *Calendula officinalis* contra os efeitos miotóxicos da peçonha de *Bothrops leucurus*.

O extrato etanólico de *Humirianthera ampla* e sua fração isolada (lupeol) foram capazes de diminuir os níveis de CK quando pré-incubados com a peçonha de *B. atrox* (STRAUCH et al., 2013).

Os extratos de *Musa paradisíaca* L. mostraram-se eficazes na neutralização de fosfolipases (PL<sub>2</sub>) e da miotoxidade induzidas por *B. neuwiedj*, *B. jararacussu* e *C. durissus terrificus* (BORGES et al., 2005) .

A avaliação do efeito do extrato sobre a atividade inflamatória induzida

pela peçonha de *B. atrox*, mostrou que não houve inibição da resposta inflamatória aguda induzida nos animais tratados com o EBg nas concentrações de 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg/ 25 µL PBS, pois não foram observadas alterações significativas na contagem total de leucócitos e no número de células mononucleares e polimorfonucleares quando comparadas às respostas apresentadas pelos animais do grupo controle PBBa.

Escocard et al. (2006), observaram que o aumento do fluxo de neutrófilos e macrófagos atingiu seu pico após seis horas e 48 horas, respectivamente, após a indução com a peçonha de *B. atrox*.

Além disso, ao compararem um grupo de camundongos com depleção de neutrófilos e um grupo de camundongos sem depleção, concluíram que os resultados obtidos não demonstraram diferença entre os efeitos hemorrágicos, edematogênico e mionecrótico induzidos pela peçonha de *B. atrox*.

Isso reforça os resultados obtidos por Kanashiro et al. (2002) que demonstraram que os eventos inflamatórios observados nos envenenamentos provocados por serpente *B. atrox* estão relacionados com mediadores químicos (histamina e bradicinina) e citocinas. Essas substâncias também estão envolvidas no processo nociceptivo em acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*.

O teste da formalina é usado para avaliar a atividade nociceptiva e corresponde a um modelo químico de nocicepção que fornece uma resposta mais específica quando comparado ao modelo do ácido acético, sendo considerado atualmente o teste que mais se aproxima da dor clínica. Neste teste, o animal apresenta duas fases diferentes de nocicepção que parece envolver estímulos diferentes (SOARES et al., 2009).

A primeira fase da avaliação da atividade nociceptiva (0 a 5 minutos) corresponde à dor neurogênica ou aguda, e está relacionada com a excitação direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e de algumas fibras do tipo A $\alpha$  (alfa), estando associada à liberação de óxido nítrico, aminoácidos excitatórios, substância P, entre outros. Já a segunda fase (entre 20 a 30 minutos) está relacionada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como a serotonina, bradicinina, prostaglandinas, entre outros (SOARES et al., 2009).

No presente estudo, foi avaliada a resposta nociceptiva apresentada por camundongos, após a administração por via subcutânea da peçonha de *B. atrox* associada ao EBg em diferentes concentrações (1:6; 1:12; 1:25; 1:37; 1:50). Os



resultados obtidos mostraram uma redução na resposta nociceptiva nos dois intervalos de tempo avaliados, sendo mais proeminente no período de 0 a 5 minutos, correspondente à dor neurogênica ou aguda .

Importante ressaltar, que o referido modelo de nocicepção, utilizando veneno de serpente, foi uma adaptação do método da formalina realizado pelo laboratório de toxicologia da UNIFAP.

Outras espécies de plantas, como a *Euterpe oleracea* Mart. (açai) e a *Rosmarinus officinalis* L. foram capazes de inibir a nocicepção causada pelo modelo de indução de contorção abdominal com ácido acético (TAKAKI et al., 2008; FAVACHO et al., 2011).

Em relação a atividade hemorrágica dos veneno de *B. atrox*, as enzimas proteolíticas são responsáveis pelo desencadeamento da mesma, tendo destaque as metaloproteases que promovem o sangramento (epistaxis, gengivoragias, hematuria, hemorragias uterinas, intratorácica ou intrabdominal), já que atuam, principalmente, sobre as integrinas que estão presentes na parede vascular e na membrana basal (FERNANDES et al., 2006).

A avaliação do efeito do EBg em diferentes concentrações (1:3; 1:6; 1:12; 1:18; 1:25), demonstraram que os animais dos grupos tratados com o extrato apresentaram redução do halo hemorrágico quando comparados aos animais do grupo PBBa. Tal fato também tem sido verificado em estudos com outras plantas medicinais, conforme descrito a seguir.

A *Humirianthera ampla* foi capaz de reduzir a atividade hemorrágica induzida por peçonha de *B. atrox* (STRAUCH et al., 2013). Além dessa espécie, a *Mandevilla velutina* inibiu em cerca de 90% a atividade hemorrágica induzida *B. jararacussu* e em 100% as atividades hemorrágicas induzida por *B. moojeni*, *B. alternatus* e *B. Pirajai* (BIONDO et al., 2003).

*Mikania glomerata* foi outra espécie que demonstrou eficácia na redução da atividade hemorrágica, pois foi capaz de reduzir em 50 a 80% o efeito hemorrágico induzidos pela peçonha de *B. alternatus*. Quando avaliou-se o seu efeito sobre as peçonhas de *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni* a mesma foi capaz de reduzir em 80 a 95 % dessa atividade (MAIORANO et al., 2005).

Da Silva et al. (2005) demonstraram que o extrato de *Pentaclethra maculoba* foi capaz de inibir a BjussuMP-I, uma metaloprotease da *B. jararacussu*.

Da Silva et al. (2007), isolaram a macrolobina A e B, compostos que foram capazes de inibir a atividade hemorrágica, fibrinogenolítica e proteolítica das classes P-I e P-III de metaloproteases isoladas de *B. neuwiedi* e *B. jararacussu*.

As metaloproteases são enzimas que precisam de íon metálico divalente para que possam exercer sua atividade. Então, supõem-se que componentes presentes nos extratos de plantas medicinais causem a inibição dessas enzimas ao se ligarem a esses íons (Zinco) (BORGES et al., 2001).

Os envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* causam coagulopatias que em associação com eventos hemorrágicos induzem um sério distúrbio hemostático. Entre as substâncias presentes na peçonha de *B. atrox* as serinoproteases estão relacionadas com o surgimento dessas alterações decorrentes do acidente botrópico.

Os resultados obtidos nos ensaios para avaliação da atividade coagulante mostraram que o EBg, nas concentrações utilizadas (1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:20), não foi capaz de neutralizar esse efeito tóxico da peçonha, quando experimentos *in vitro* foram realizados utilizando plasma humano com citrato de sódio, incubado em banho-maria a 37°C por 5 min.

Moura et al. (2011) demonstraram a capacidade da inibição da coagulação induzida pela peçonha de *L. muta* pelo dolastane, um diterpeno isolado da alga *Canistrocarpus cervicornis*,

A *Mikania glomerata* também mostrou capacidade em neutralizar a coagulação induzida tanto pela peçonha de *C. durissus terrificus* quanto pela peçonha de diferentes serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*)

A *Humirianthera ampla* foi eficaz na inibição da atividade coagulante induzido pela peçonha de *B. atrox* (STRAUCH et al., 2013), assim como, o extrato de *Bauhinia forficata*, o qual inibiu totalmente a atividade coagulante induzido pela peçonha *B. jararacussu* mas, não foi capaz de inibir a atividade coagulante induzida pela peçonha de *B. moojeni* (OLIVEIRA et al., 2005).

Sendo assim, o presente estudo mostrou que o extrato produzido a partir da planta *Brosimum guianense*, pode ser promissor para a realização de outros ensaios utilizando peçonhas de serpentes, e posterior fracionamento e purificação, tendo em vista que a busca por compostos ativos com propriedades terapêuticas

torna-se necessário, devido a deficiência da terapêutica atual em neutralizar os efeitos locais produzidos por esses envenenamentos.

Importante ressaltar que os fitoterápicos ou compostos ativos obtidos a partir de plantas medicinais, não devem apresentar como propósito, a substituição dos imunobiológicos, e sim a possibilidade de serem utilizados como coadjuvantes no tratamento dos efeitos locais, causados pela ação das peçonhas de serpentes.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O envenenamento provocado por serpentes peçonhentas é um processo complexo, decorrente de alterações fisiológicas induzidas pelas substâncias biologicamente ativas que estão presente nas peçonhas desses animais.

Diversos estudos com plantas medicinais demonstraram a eficácia terapêutica destas, quando utilizadas para neutralizar as ações decorrentes dos envenenamentos ofídicos. No Estado do Amapá, a planta *Brosimum guianense* é utilizada popularmente no tratamento destes acidentes.

Os resultados do presente estudo mostraram que o extrato bruto aquoso, obtido a partir das folhas de *B. guianense*, não foi eficaz na neutralização das atividades coagulante e hemolítica indireta por fosfolipases A2, induzidas pela peçonha da serpente *Bothrops atrox*.

Nos ensaios realizados *in vivo*, o EBg não apresentou eficácia na inibição das atividades inflamatória, edematogênica e miotóxica.

Porém, observou-se que o referido extrato possui compostos ativos com propriedades inibitórias sobre a nocicepção e a hemorragia desencadeadas pela peçonha da serpente *Bothrops atrox*. Sendo assim, torna-se necessário a realização de estudos de fracionamento e purificação do referido extrato e posteriores ensaios para avaliação dos efeitos destes compostos sobre as atividades tóxicas desencadeadas pelo veneno.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, V. G. C. et al. Chemical constituents from the stem of *Brosimum potabile* (Moraceae). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 4, p. 711 – 718, 2010.
- ADUKAUSKIENÈ, D.; VARANAUSKIENÈ, E.; ADUKAUSKAITÈ, A. Venomous snakebite. **Medicina**, v. 47, n. 8, p. 461-467, 2011.
- ALBERTINI, R. et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **Journal of photochemistry and photobiology**, v. 89, n. 1, p. 50-55, 2007.
- ALMEIDA, V. B.; JARDIM, F. C. S. Crescimento diamétrico de *Brosimum guianenses* em uma floresta tropical após a colheita de madeira, Moju-PA. **Revista de Ciências Agrárias**, vol. 55, n. 2, p 105-110, 2012.
- AMUI, S. F. et al. Plant-antivenom: Database of anti-venom medicinal plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol 14, n. 1, 2011.
- ASUZU, I. U.; HARVEY, A. L. The anti-snake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p.763-768, 2003.
- BALDO, C. et al. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 54-65, 2008.
- BARBOSA, A. M. et al. Effect of low-level therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 51, n. 7, p. 1236-1244, 2008.
- BERNADE, P. S.; GOMES, J. O. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 1, p , 2012.
- BORGES, M. H. et al. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourticeae). **Toxicon**, v. 39, p. 1863-1869, 2001.
- BORGES, M. H. et al. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, n. 1-2, p. 21-29, 2005.
- CALGAROTTO, A. K. et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1509-1519, 2008.
- CALVETE, J. J. et al. 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.

CALVETTE, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, 1736-1743, 2009.

CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

CASS, H.; COTT, J. Herbal Medicine. In: SHANNON, S. Handbook of Complementary and Alternative Therapies in Mental Health. San Diego: Academic Press, p. 377-400, 2002.

CHAST, F. A Brief History of Drugs: From Plant Extracts to DNA Technology. In: Wermuth, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. London: Academic Press, p. 3-28, 2008.

CINTRA, A. C. O. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, Vol. 60, n. 1, p. 70-82, 2012

NETTO, C.C. Estudo imunoquímico do veneno de *Bothrops jararacussu*, Lacerda, e identificação de moléculas biomarcadoras como ferramenta para o desenvolvimento de diagnóstico. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Tecnologia de Imunobiológicos, Rio de Janeiro.

DA COSTA, H. N. R. et al. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (LAMIACEAE). **Quim. Nova**, v. 31, n. 4, p. 744-750, 2008.

DA SILVA, I. R. F. et al. BJ-PI2, A non hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 11, p. 1809-1821, 2012.

DA SILVA, J. O. et al. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 145-152, 2005.

DA SILVA, J. O. et al. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 283-291, 2007.

DA SILVA, N. M. V. et al. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, p. 196-205, 2007.

DE ALVARENGA, E. S. et al. Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, vol. 57, n. 1, p. 100 – 108, 2011

DE OLIVEIRA, A. L. et al. Avaliação epidemiológica e laboratorial de pacientes que sofreram acidente ofídico na cidade de Miracatu (Vale do Ribeira, São Paulo). **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 268-274, 2008.

DE OLIVEIRA, D. P. C. et al. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por peçonhas de serpentes amazônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 643-649, 2009.

DOS SANTOS, S. A. Estudo Químico e Farmacológico de *Brosimum guianense* e Análises Espectrométricas de Isoflavonóides e Sesquiterpenóides. 1994. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ESCALANTE, T. et al. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 455, n. 2, p. 144-153, 2006.

ESCOCARD, R. C. M. et al. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines, and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Immunobiology**, v. 211, n. 1-2, p. 37-46, 2006.

ESPINO-SOLIS, G. P. et al. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-199, 2009.

FAVACHO, H. A. S. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae, oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 105-114, 2011.

FERNANDES, C. M. et al. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 549-559, 2006.F

FONSECA, C. N.; LISBOA, P. L. B.; URBINATI, C. V.A. Xiloteca (Coleção Walter A. Egler) do Museu Paraense Emílio Goeldi. **Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 1, n. 1, p. 65-140, 2005.

FONSECA, F. V. et al. Extratos de *Curcuma longa* L. e *Kalanchoe brasiliensis* Camb. no tratamento local do envenenamento por *Bothrops alternatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1 p. 26-29, 2004.

FRANCO, F.L. Origem e Diversidade das Serpentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil. São Paulo: Sarvier, p. 22-41, 2003.

FURTADO, M. F. et al. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos: I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 53, p. 149-159, 1991.

GALLAGHER, P. et al. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: In vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 441, n. 1, p. 1-15, 2005.

GARCIA, E. S. Biodiversity, Biotechnology and Health. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 495-500, 1995.

GONZÁLEZ-ANDRADE, F.; CHIPPAUX, J.P. Snake bite Envenomation in Ecuador. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 9, p. 588-591, 2010.

GUITIÉRREZ, J. M. et al. 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.

GUITIÉRREZ, J. M. et al. Improving antivenom availability and accessibility: Science, technology, and beyond. **Toxicon**, v. 60, p. 676-687, 2012.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective?. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 166-170, 2010.

GWALTNEY-BRANT, S. M. et al. Terrestrial zootoxins. In: GUPTA R. C. *Veterinary Toxicology*. Oxford: Academic Press, p. 785-801, 2007.

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007.

HARVEY, A. L. Snake Venom Peptides. In: KASTIN, A. J. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Burlington: Academic Press, p. 355-362, 2006.

HEDQVIST, P.; GAUTAN, N.; LINBOM, L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 117-119, 2000.

HOWGOOD, B.J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brasil (1865-1950). **Toxicon**, v. 30, n. 5-6, p. 573-579, 1992.

HUANCAHUIRE-VEGA, S. et al. Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A2 isolated from *Porthidium hyoprora* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology**, v. 154, n. 2, p. 108-119, 2011.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formain test in mice, a useful technic for evaluation mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, n. 1, p. 769-785, 1985.

ITOH, N. et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 3132-3135, 1987.



INSTITUTO VITAL BRASIL. [http://www.ivb.rj.gov.br/cobras\\_venenosas.html](http://www.ivb.rj.gov.br/cobras_venenosas.html). Acessado em 20 de dezembro de 2012.

JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S. R. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). **Acta Bot. Bras.** vol.21, n.3, pp. 575-597, 2007.

KANASHIRO, M. M. et al. Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 7, p. 1179-1186, 2002.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. Enzimas. In: Química Clínica – Técnicas de Laboratório – Fisiopatologia – Métodos de Análises. Buenos Aires: Médica Panamericana, p. 1273, 1986.

KASTURIRATNE, A. et al. The global snake burden of snakebite: A literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLOS Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1591-1604, 2008.

KING, T.C. **Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

KIRBY, E. P. et al. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom: 1. Purification and characterization of the enzyme. *Biochemistry*, v. 18, p. 3564-3570, 1979.

KISNER, C.; COLBY, L.A. **Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas**. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 2005.

KOH, D. C.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol. Life Science**, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.

KOHLHOFF, M. et al. Exploring the proteomes of the venoms of Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 7, p. 2181-2195, 2012.

KONDO, H. et al. Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v.13, p. 43-51, 1960.

LALLOO, D. Venomous bites and stings. **Medicine**, v. 33, n. 8, p. 74-76, 2009.

LEITE, C.E. et al. Extrato aquoso de *Baccharis trimera* (ASTERACEAE) diminui a inflamação e o dano celular em pleurisia induzida por peçonha de *Dirphia sp.* (SATURNIIDAE). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 1, p. 29-32, 2007.

LIMA, A.C.S.F.; CAMPOS, C.E.C.; RIBEIRO, J.R. Perfil epidemiológico de acidentes ofídicos do Estado do Amapá. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 329-335, 2009a.

LIMA, J. S. et al. Perfil dos acidentes ofídicos no norte do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 561-564, 2009b.

LIRA-DA-SILVA, R. M. et al. Serpente de importância médica do nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, p. 7-20, 2009.

LOMONTE, B. et al. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon*, v. 28, n. 10, p. 1137-1146, 1990.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil - Vol. 03. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2002.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J.. Snake venoms and hemostasis. **J Thromb Haemost**, vol 3, p. 1791-1799, 2005.

MAGALHÃES, A. et al. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 1, p. 82-88, 2011.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 364-370, 2005.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, v.36, p. 1749-1800, 1998.

McCHESNEY, J.D. et al. Plant natural products: Back to the future or into extinction?. **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

MEBS, D. Toxicity in animals. Trends in evolution?. **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 87-96, 2001.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, no. 7203, p. 428-35, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação de Saúde, 2001.

MISE, Y. F. et al. Ação protetora da *Calendula officinalis* (Asteraceae; Compositae) sobre a atividade miotóxica do veneno de *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, p. 50-55, 2009.

MOREIRA, V. et al. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12-20, 2012.

MOURA, L. A. et al. Antiophidian properties of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 61-66, 2011.

NADUR-ANDRADE, N. et al. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. **Lasers Med Sci**, v. 27, p. 65–70, 2012.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 826-852, 2002.

NEIVA, M. et al. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**, v. 53, n. 4, p. 427-436, 2009.

NÚÑEZ, V. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 57-78, 2009.

OBJETOS EDUCACIONAIS.

<http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/bitstream/handle/mec/6309/cranio%20crotalus%202.jpg?sequence=2>. Acessado em 21 de novembro de 2012.

OLIVEIRA, C. Z. et al. 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.

OLIVEIRA, D. P. C. et al. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 19, n.2b, p. 643-649, 2009.

OTERO-PATIÑO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. **Toxicon**, v. 54, n.7, p. 998- 1011, 2009.

PANFOLI, I. et al. Inhibition of Hemorrhagic Snake Venom Components: Old and New Approaches. **Toxins**, v. 2, p. 417-427, 2010.

PANTIGOSO, C. et al. Isolation and some properties of the proteinase atroxin from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Acta Cient. Venez.**, v. 47, p. 67-73, 1996.

PATIÑO, A. C. et al. Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 936-94, 2010.

PEDERNEIRAS, L. C. et al. Moraceae das restingas do estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 62 n. 1, p. 77-92, 2011.

PICOLO, G. et al. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, no. 10, oct. 2002.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Revista Assoc. Med.Bras**, v. 47, n 1, jan./mar., 2001.

- POZETTI, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 159-166, 2005.
- RAMOS, D. F. et al. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, 2008
- REIS, L. P. et al. Avaliação do potencial madeireiro na Floresta Nacional do Tapajós, após 28 anos da exploração florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 30, n. 64, p. 265-281, 2010
- RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.
- RIBEIRO, L. A.; JORGE, M.T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 30, no. 6, nov./dez., 1997.
- ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual review of pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.
- RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. et al. Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabellae* venom. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 926-935, 2010.
- RUCINSKI, B. et al. Batroxostatin, an Arg-Gly-Asp- containing peptide from *Bothrops atrox*, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1054, p. 257-262, 1990.
- SÁ, R. C. S. et al. Avaliação preliminar do potencial estrogênico de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr., Fabaceae, *Platypodium elegans* Vogel, Fabaceae, and *Brosimum guianense* (Aubl.) Huber, Moraceae, no sistema reprodutor de ratos Wistar. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 20, n. 6, p. 950-955, 2010.
- SAJEVIC, T. et al. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627-645, 2011.
- SALAZAR, A. M. et al. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. **Thrombosis Research**, v. 120, n. 1, p. 95-104, 2007.
- SALDARRIGA, M. M. et al. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v. 42, n. 4, 405-411, 2003.
- SANCHEZ, E. F. et al. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 496, n. 1, p. 9-20, 2010.

SCHOLZ, G. et al. Chemical, anatomical and technological properties of Snakewood *Brosimum guianenses* (Aubl.) Huber. **Wood Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 673-686, 2007.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, no. 3, p. 385-405, 2004.

SOARES DE MOURA R. et al. Bronchodilator activity of Mikania glomerata Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **J Pharm Pharmacol**, v. 54, n. 2, p. 249-256, 2002.

SOARES, A. M. et al. Medicinal Plants with Inhibitory Properties Against Snake Venoms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 22, p. 2625-2641, 2005.

SOARES, C.C. et al. Atividade analgésica do extrato da *Pectis jangadensis* (S. Moore). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1a p. 77-81, 2009.

SOUSA, E. A. et al. Influence Of A Low-Level Semiconductor Gallium Arsenate Laser In Experimental Envenomation Induced By *Bothrops Atrox* Snake Venom. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 141-148, 2012.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and actions**. v. 17 (1), p.97-103, 1985.

STABELI, R. G. et al. Bothrops moojeni Myotoxin-II, a Lys49-Phospholipase A2 Homologue: an Example of Function Versatility of Snake Venom Proteins.. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 142, n.3-4, p. 371-381, 2006.

STOCKER, K.; BARLOW, G.H. The coagulant enzyme from Bothrops atrox venom (bathroxobin). In: LORAND, L. (Ed.) *Methods of Enzymology*, v. 45B. New York: Academy Press, 1976, p.214.

STRAUCH, M. A. et al. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant Humirianthera ampla and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, n. 1, 50-58, 2013.

TAKAKI, I. ; BERSANI-AMADO, L. E. ; VENDRUSCOLO, A. ; SARTORETTO, S. M. ; DINIZ, S. P. ; BERSANI-AMADO, C.A. ; CUMAN, R. K .N. . Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of Rosmarinus officinalis L. Essential Oil in Experimental Animal Models . **Journal of Medicinal Food, Pondicherry**, v. 11, p. 741-746, 2008..

TEIXEIRA, C.F.P. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947-962, 2003.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snakes venenoms. **Bulletin of the World**

**Health Organization**, v.61, p.949-856, 1983.

TORRES, S. L. et al. Two flavans from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 347-349, 1997

USDA, ARS, National Genetic Resources Program.  
*Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Online Database].  
National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.  
<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?320203>. Acessado em 10 de outubro de 2012.

UTESCHER, C.A. et al. Avaliação da eficácia do anti-peçonha botrópico administrado no local da inoculação intramuscular do veneno de *Bothrops jararaca*: estudo experimental em camundongos. **Revista Instituto Medicina Tropical**, p. 275-278, mai/jun, 1994.

VILAR, J.C. et al. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas. **Biologia geral e experimental**, v.7, n. 2, p. 32-39, 2007.

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. 2, p. 681-692, 2009.

WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**. Vol. 375, n. 9708, 77- 88, 2010.

WHITE, J.; PERSSON, H. Snakes. In: DESCOTES, J. Human Toxicology. Amsterdam: Elsevier Science B.V., p. 757-802, 1996.

WILLIAMS, D. et al.. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 89-91, 2010.

YAMAKAWA M. et al. Fractionation of Sakishima habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal hemorrhagic and edema forming activities of the fractions. In: Ohsaka A., Hayashi K., Sawai, Y., editors. Animal, plants and microbial toxins. 1 ed. New York: Plenum Press, 1976, p. 97-109.

ZYCHAR, B.C. et al. Phenol used as a preservative in *Bothrops* antivenom induces impairment in leukocyte-endothelial interactions. **Toxicon**, v. 51, n. 7, p. 1151-1157, 2008.

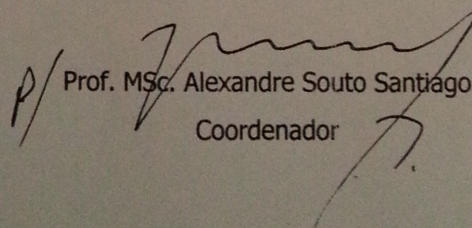
**ANEXO A - Certificado de aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa****UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo no. 009A/2011 – CEP sobre "**Avaliação da eficácia do extrato bruto aquoso de *Brosimum guianense* sobre os efeitos induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox***", sob a responsabilidade de **José Adolfo Homobono Machado Bittencourt**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIFAP, em reunião realizada em 24/10/2011.


**CERTIFICATE**

We certify that the protocol number 009A/2011 about "**Avaliação da eficácia do extrato bruto aquoso de *Brosimum guianense* sobre os efeitos induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox***", **José Adolfo Homobono Machado Bittencourt**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adapted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Research Ethical Committee (CEP-UNIFAP) in 24/10/2011.

Macapá, 24 de outubro de 2011

  
P/ Prof. MSc. Alexandre Souto Santiago  
Coordenador

Universidade Federal do Amapá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – Comitê de Ética em Pesquisa  
Rod. JK km 2, Marco Zero CEP 68908-130 – Macapá – AP - Brasil  
Email: cep@unifap.br

**ANEXO B - Termo de Identificação da *B. guianense*.**

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas

---

DOC./UNIFAP N.º 01/2013 Macapá (AP), 18 de fevereiro de 2013

Para: José Adolfo  
Acadêmico do Curso de Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal do Amapá

Ref.: **Solicitação de inclusão e identificação de planta oriunda do Terreno da Rodovia JK, próximo ao ramal de Cascalheira de Macapá – Ap.**

---

Prezado,

A espécie referente ao material coletado foi devidamente incorporada ao acervo do Herbário da Universidade Federal do Amapá – HUFAP, no qual para cada exemplar foi montada exsicata e duplicatas, ficha de coleta e registro no Herbário e no banco de dados. Segue em anexo a lista de espécie, com o respectivo nº de registro.

Observações: O período mínimo de entrega das identificações é de 30 dias a partir desta data, podendo ser prorrogado até 90 dias devido a carência de especialistas no estado do Amapá.

Sem mais para o momento,

Atenciosamente,

  
Wegliane Campelo da Silva Aparicio  
Dr.<sup>a</sup> Ciências Florestais/ UFRPE  
Prof.<sup>a</sup> do Curso de Ciências Biológicas / UNIFAP  
Curadora do Herbário da Universidade Federal do Amapá - HUFAP