



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**BETSY DANTAS DE MEDEIROS**

**AVALIAÇÃO DE PRODUTOS VEGETAIS NA INIBIÇÃO DE ATIVIDADES  
INDUZIDAS PELA PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas* Amaral (1923)**

**CAMPINA GRANDE  
2018**

**BETSY DANTAS DE MEDEIROS**

**AVALIAÇÃO DE PRODUTOS VEGETAIS NA INIBIÇÃO DE ATIVIDADES  
INDUZIDAS PELA PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas* Amaral (1923)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.  
Área de concentração: Toxinologia.

Orientador: Prof. Dr. Karla Patrícia de Oliveira Luna.

**CAMPINA GRANDE  
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

M488a Medeiros, Betsy Dantas de.  
Avaliação de produtos vegetais na inibição de atividades induzidas pela peçonha de *Bothrops erythromelas* Amaral (1923) [manuscrito] : / Betsy Dantas de Medeiros. - 2018.  
29 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.

"Orientação : Profa. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna, Coordenação de Curso de Biologia - CCBS."

1. Plantas antiofídicas. 2. Veneno botrópico. 3. Atividade biológica. 4. Jararaca-da-seca.

21. ed. CDD 581.634

BETSY DANTAS DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DE PRODUTOS VEGETAIS NA INIBIÇÃO DE ATIVIDADES  
INDUZIDAS PELA PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas* Amaral (1923)**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Programa de Graduação  
em Ciências Biológicas da Universidade  
Estadual da Paraíba, como requisito  
parcial à obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

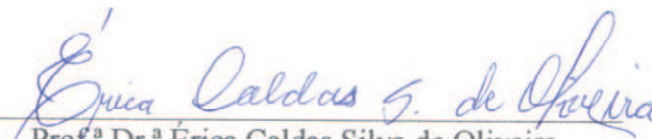
Área de concentração: Toxinologia.

Aprovada em: 15/06/2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karla Patrícia de Oliveira Luna (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érica Caldas Silva de Oliveira  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Harley da Silva Alves  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus pais e irmã, por todo o incentivo, apoio,  
pelo amor incondicional, e por acreditarem em mim  
sempre, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por Sua infinita bondade e por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, Cícero e Betânia, que são minha base, por todo o apoio, incentivo, que me impulsionam para seguir em frente. Sem eles, eu nada seria. Obrigada por todas as vezes que vocês deixaram de dormir para me ajudar e por todo o tempo dedicado a mim, de todas as formas possíveis.

À minha irmã e melhor amiga, Danieli, por me escutar e estar sempre comigo, não importa o tempo ou distância que nos separe. À Galo, por me transmitir paz e tranquilidade.

Meus avós, Francisca, Pila, Miguel, e Petronila (*in memorian*) por serem meus portos seguros, meu ponto de equilíbrio, onde encontro a maior paz.

Aos meus amigos, que estão comigo desde sempre, na minha melhor e pior versão, e que são partes de mim. Obrigada, por todas as vezes que me escutaram, ou ficaram do meu lado, me fazendo sorrir nos meus dias mais cinzas. Amo vocês (sem citar nomes, para não esquecer nenhum).

Aos meus colegas, que passaram comigo todas as alegrias e dificuldades do curso. Que foram os melhores colegas de classe, e amigos que encontrei pelo caminho. Sentirei falta até dos dias difíceis com vocês.

À minha família, que é minha fortaleza e sempre me dá suporte e coragem para seguir.

Aos meus professores, pelos conhecimentos passados, pela dedicação no ensino e por despertar a vontade de aprender sempre mais.

À minha orientadora, Karla Luna, por toda a preocupação e dedicação, que mesmo diante das limitações, buscou e propiciou os meios para que eu pudesse desenvolver esse estudo a tempo. Muito obrigada, pelos puxões de orelha, por respeitar meu tempo, e pela confiança.

Ao professor Harley da Silva Alves e equipe, por ceder os extratos e todas as informações necessárias para o desenvolvimento desse estudo. Ao professor Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa, que cedeu o laboratório e auxiliou na realização desse projeto.

Às pessoas que, mesmo sem obrigação, me ajudaram na realização desse trabalho. Anderson, Ellynes, Juliana, Sarah e Diana, muito obrigada, de coração!

E a todos que me ajudaram, de alguma forma, nesse trajeto, muito obrigada!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>07</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>11</b>
2.1	Material vegetal.....	11
2.1.1	<i>Coleta das plantas e identificação.....</i>	<b>11</b>
2.1.2	<i>Preparo dos extratos.....</i>	<b>12</b>
2.2	Peçonha ofídica.....	12
2.3	Ensaio enzimáticos <i>in vitro</i> .....	12
2.3.1	<i>Ensaio de neutralização pelo método de Ouchterlony.....</i>	<b>12</b>
2.3.2	<i>Inibição da atividade proteolítica sobre a azocaseína.....</i>	<b>13</b>
2.3.3	<i>Inibição da atividade fosfolipase A<sub>2</sub>.....</i>	<b>14</b>
2.3.4	<i>Inibição da atividade hialuronidásica.....</i>	<b>15</b>
2.4	Análise estatística.....	15
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO. ....</b>	<b>16</b>
3.1	Imunodifusão dupla de Ouchterlony.....	16
3.2	Avaliação da atividade proteolítica sobre a azocaseína.....	17
3.3	Avaliação da inibição da atividade fosfolipásica.....	18
3.4	Avaliação da inibição da atividade hialuronidásica.....	19
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>22</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>24</b>



## AValiação DE PRODUTOS VEGETAIS NA INIBIÇÃO DE ATIVIDADES INDUZIDAS PELA PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas* Amaral (1923)

Betsy Dantas de Medeiros\*

### RESUMO

Acidentes ofídicos representam um grave problema de saúde pública. No Brasil, o gênero *Bothrops* é responsável por 90% dos acidentes ofídicos, sendo a espécie *B. erythromelas* responsável pelo maior número desses acidentes no Nordeste brasileiro. O envenenamento botrópico gera múltiplos efeitos locais e sistêmicos que se caracterizam por dor, edema, necrose tecidual, hemorragias e coagulopatias. O soro antiofídico é o antiveneno convencional utilizado, o qual neutraliza eficientemente os efeitos sistêmicos, mas não os efeitos locais. Nesse contexto, há necessidade de pesquisas que visem alternativas complementares à soroterapia. O presente estudo teve como objetivo realizar uma avaliação dos potenciais antiofídicos de extratos das espécies *Apodanthera congestiflora*, *Cnidocolus quercifolius* e *Tacinga palmadora* frente ao veneno da serpente *Bothrops erythromelas*. Ensaio *in vitro* utilizando ensaio de imunodifusão dupla de Ouchterlony e o método de avaliação da turbidimetria, com leitura de microplacas de 96 poços, foram realizados para analisar a inibição das atividades hialuronidásica, fosfolipásica e proteolítica, importantes no envenenamento botrópico, nas proporções 1:1, 1:10, 1:50 e 1:100 (veneno:extrato). Os resultados demonstraram uma inibição de 32,73% da atividade proteolítica na proporção de 1:50 (veneno:extrato) para *C. quercifolius*, uma taxa de inibição ótima da atividade hialuronidásica de 100% e 91% para *A. congestiflora* e *T. palmadora*, respectivamente, e inibição de 10% da atividade fosfolipásica para *T. palmadora*. Diante dos resultados, pode-se concluir que os extratos destas espécies podem constituir fontes de moléculas bioativas com atividades antiofídicas contra a peçonha de *B. erythromelas*, e que possam auxiliar no tratamento dos efeitos locais deflagrados pelos envenenamentos botrópicos.

**Palavras-Chave:** Plantas antiofídicas. Veneno botrópico. Atividade biológica. Jararaca-da-seca.

### 1 INTRODUÇÃO

Existem cerca de 3.672 espécies de serpentes no mundo (UETZ; FREED; HOŠEK, 2017), distribuídas em 20 famílias. O Brasil possui 10% do total de espécies conhecidas, distribuídas em 9 famílias, 75 gêneros e 392 espécies (CARDOSO et al., 2009; COSTA; BERNILS, 2015). Dentre estas, duas famílias abrangem as serpentes peçonhentas que são consideradas de interesse da saúde no país: a família Viperidae, a qual inclui os gêneros *Crotalus* (Cascavel), *Bothrops* e *Bothrocophias* (Jararaca) e *Lachesis* (Surucucu); e a família Elapidae, que engloba o gênero *Micrurus* (Coral) (BERNARDE, 2014; BRASIL, 2009).

---

\* Aluna de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – Campus I.  
Email: betsydantas@gmail.com

No Brasil ocorrem aproximadamente 29.000 acidentes ofídicos por ano, com uma taxa de letalidade de aproximadamente 0,44% (BERNARDE, 2014). Destes, 85% ocorrem com as espécies do gênero *Bothrops* (SARTIM et al., 2016). Na Paraíba, em 2016, foram notificados 2.086 casos de acidentes ofídicos, sendo 1.807 não identificados e 222 do gênero *Bothrops* (DATASUS, 2018).

Os gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* representam o grupo mais importante de serpentes peçonhentas no Brasil, sendo catalogadas mais de 60 espécies em todo território (BRASIL, 2009). Seu veneno se constitui por misturas complexas compostas por diversas proteínas e peptídeos biologicamente ativos que tem potencial para induzir quadros inflamatórios locais, a exemplo da mionecrose, hemorragia, bolhas e edema; e distúrbios hemostáticos sistêmicos notados a partir do envenenamento, como coagulopatia, hemorragia, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda. (BERNARDE, 2014; BRASIL, 2009; NASCIMENTO, 2007).

A peçonha botrópica possui três ações principais: hemorrágica, coagulante e proteolítica, desencadeadas por ação conjunta das diversas toxinas encontradas no veneno, como fosfolipases A2 (*Phospholipase A2* - PLA2), metaloproteases (*Snake venom metalloproteases* - SVMPs), serinoproteases (*Snake venom serine proteases* - SVSPs), miotoxinas, hialuronidases e nucleotidases (BRASIL, 2001).

A atividade hemorrágica da peçonha se deve principalmente a ação de hemorraginas ou SVMPs, que promovem a degradação dos componentes da matriz extracelular do endotélio, como colágeno IV, laminina e fibronectina, causando o aumento da permeabilidade vascular, desestruturando a parede do vaso e causando a hemorragia. As SVMPs são responsáveis também por efeitos locais como dor, edema, inflamação e necrose (AMORIM et al., 2017; ARAÚJO et al., 2011; VILLALTA-ROMERO et al., 2017).

A atividade coagulante é desencadeada pela presença de SVSPs do tipo *thrombin-like*, que hidrolisam o fibrinogênio em fibrina para formação do coágulo plaquetário; e de pró-coagulantes ativadores do fator II (protrombina) e do fator X. As SVSPs são capazes de interferir na regulação das principais reações biológicas na cascata de coagulação sanguínea, sistema fibrinolítico e indução da agregação plaquetária no sangue, podendo provocar incoagulabilidade sanguínea e coagulação intravascular disseminada (BRASIL, 2001; SANTOS et al., 2018; SENISE, 2014).

Das ações principais do veneno, Azevedo-Marques, Cupo e Hering (2003), destacaram a atividade proteolítica como a de maior importância para caracterização do acidente, por meio de seus efeitos clínicos. A atividade proteolítica é causada por proteases, encontradas em

abundância nas peçonhas ofídicas, que possuem ação citotóxica direta nos tecidos, podendo acarretar necrose tecidual. As proteases presentes na peçonha agem degradando proteínas teciduais ou clivando proteínas da parede vascular, gerando efeitos potentes sobre a hemostasia da vítima (GOPI et al., 2016; SANTOS et al., 2018; SARTIM et al., 2016). Portanto, a inibição das proteases dos venenos é de suma importância quando se estuda a atividade antiofídica de moléculas (CARDOSO, 2009).

Além das proteases, as hialuronidases e PLA2 provocam a liberação de mediadores da resposta inflamatória, sendo responsável pelo dano tecidual local (BRASIL, 2001). As PLA2 são as enzimas mais abundantes do veneno botrópico, hidrolisam os fosfolípídeos de membrana, liberando o ácido araquidônico, que está envolvido na biossíntese de mediadores inflamatórios, gerando como efeitos hemólise, miotoxicidade, efeitos na agregação plaquetária e formação de edema (GOPI et al., 2016; KANG et al., 2011; PEREIRA et al., 2010). A hialuronidase tem como substrato o ácido hialurônico presente na matriz extracelular. Ela é responsável por degradá-lo, atuando como um “fator de espalhamento”, contribuindo na rápida difusão das toxinas a partir da inoculação até os tecidos e sistema circulatório das vítimas, potencializando a toxicidade da peçonha, possuindo um papel fundamental no envenenamento ofídico (BORDON, 2012).

O tratamento indicado para o envenenamento é a soroterapia antiveneno, que utiliza o soro hiperimunizado provindo de cavalos (VILAR; CARVALHO; FURTADO, 2005). Apesar de reverter de maneira satisfatória os efeitos sistêmicos, a soroterapia é pouco eficaz na neutralização de efeitos locais. Além disso, o soro antibotrópico fabricado no Brasil não inclui o veneno de *B. erythromelas*, espécie endêmica da Caatinga e responsável pelo maior número de acidentes ofídicos notificados na Paraíba (JORGE et al., 2015; NUNES, 2016; OLIVEIRA, 2011). Diante do exposto, Luna et al. (2010) realizaram uma análise de eficiência de neutralização da peçonha pelo soro antibotrópico distribuído nacionalmente, no qual foi observado a existência de componentes da peçonha com peso molecular variando entre 29 e 31 kDa que não foram neutralizados de maneira eficiente pelo soro antiofídico comercial.

Muitas espécies da flora brasileira são utilizadas pela população para o tratamento de acidentes ofídicos e muitas delas nunca foram estudadas experimentalmente pela comunidade científica para verificar e validar cientificamente tal potencial (MOURA; MOURÃO; SANTOS, 2015; VILAR, 2005). O estudo do efeito de extratos vegetais sobre as diferentes atividades dos venenos tem se revelado promissor, pois várias espécies têm mostrado efeitos neutralizantes das peçonhas ofídicas (FELIX-SILVA et al., 2014, 2017; FERNANDES, 2011; MOURA et al., 2014, 2016; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004). O Nordeste possui uma

diversidade de plantas frequentemente utilizadas como medicinais no tratamento de diversas enfermidades (MOSCA, 2009).

A *Apodanthera congestiflora* Cogn. (Cucurbitaceae) compreende uma espécie endêmica do Brasil, presente nas regiões Nordeste e Sudeste (REFLORA, 2018). A planta é conhecida popularmente por “cabeça-de-negro”, sendo reportado seu uso pela população como planta medicinal para tratamento de dores na coluna, dores de dente, manchas na pele, coceira e dores em geral, indicando um potencial analgésico (DA SILVA, 2012; ROQUE, 2010). Um estudo realizado com outra espécie do gênero, *A. villosa*, por Carvalho, Vilar e Furtado (2007), apontou que o extrato aumentou o tempo de sobrevivência de animais experimentais inoculados com peçonha de *Bothrops jararaca*.

A *Tacinga palmadora* (Britton & Rose) N.P. Taylor & Stuppy (Cactaceae) é endêmica do Nordeste do Brasil e conhecida como “palmatória” ou “quipá” (REFLORA, 2018; TAYLOR et al., 2017). As cactáceas têm sido amplamente utilizadas na medicina popular como analgésicos, antibióticos, diuréticos e para problemas intestinais (HOLLIS, 1995). A *T. palmadora* é utilizada pela população local do Nordeste, sendo seu chá empregado para fins terapêuticos contra asma, parasitose, inflamações em geral e problemas uretrais (ALBUQUERQUE, 2007; ANDRADE; MARQUES; ZAPPI, 2006).

A *Cnidoscolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae), endêmica da Caatinga, possui como característica a presença de tricomas urticantes, que se concentram em quase todas as suas partes vegetativas e florais que, em contato com a pele, podem causar dor intensa e localizada (GOMES et al., 2014a; MELO; SALES, 2008). *C. quercifolius* é conhecida pela população como “favela” ou “faveleira” e possui múltiplos usos na medicina popular, dentre eles, destacam-se a ação anti-inflamatória, antisséptica, anti-hemorrágica, antimicrobiana para o tratamento de infecções renais, dermatológicas, hematomas (AGRA et al., 2008) e como cicatrizante, no tratamento de feridas (OLIVEIRA; FERNANDES; COSTA JÚNIOR, 2011). As atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antimicrobiana foram reportadas e validadas cientificamente em outros estudos (GOMES et al., 2014a,b; PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012).

Tendo em vista a quantidade de acidentes ofídicos que ocorrem no país, com considerável taxa de morbidade e mortalidade, e a não inclusão da peçonha de *B. erythromelas* no *pool* do soro antiveneno distribuído nacionalmente, é importante o desenvolvimento de estudos que busquem terapias alternativas ou complementares para o tratamento destes envenenamentos. O uso de produtos naturais para tal finalidade se torna interessante, considerando a facilidade de obtenção do mesmo na natureza e o amplo

potencial terapêutico de tais substâncias, que vem sendo demonstrado por diversos grupos. Assim, os extratos vegetais podem ser uma alternativa complementar ao tratamento ofídico.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos inibitórios dos extratos das espécies vegetais de *Apodanthera congestiflora*, *Tacinga palmadora* e *Cnidocolus quercifolius* frente ao veneno da serpente *Bothrops erythromelas*, além de determinar concentrações ótimas para neutralização das atividades proteolítica, fosfolipásica e hialuronidásica deflagradas pelo veneno botrópico.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Material vegetal**

#### **2.1.1 Coleta das plantas e identificação**

As raízes da *T. palmadora* (TP) foram coletadas em setembro de 2016 (período de seca), no Sítio Farinha, próximo a praça do Meio do Mundo, latitude: -7.15, longitude: -36.1167, distrito Nazaré, município de Pocinhos, Paraíba. O material vegetal foi preparado para confecção da exsicata e enviado ao Herbário Jayme Coelho de Moraes da UFPB/Areia e está registrada sob o número EAN 1724.

As partes aéreas da *C. quercifolius* Pohl (CQ) foram coletadas nas cidades de Santa Luzia e São Mamede, localizadas na mesorregião da Borborema e microrregião do Seridó Ocidental do Estado da Paraíba, nas seguintes coordenadas geográficas, respectivamente, 6° 52' 19''s e 36° 55' 08''o, e 6° 55' 19''s e 37° 05' 45''o, a partir de plantas adultas selecionadas.

As raízes de *A. congestiflora* Cogn. (AC) foram coletadas na cidade de Barra de Santana, Paraíba, no mês de Novembro de 2015 (coordenadas: 6° 43' 18'' s e 36° 3' 46'' o). O material foi identificado e depositado no Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) na Universidade Estadual da Paraíba, sob o número 1000.

O processo de secagem das plantas foi realizado em estufa com renovação e circulação de ar, à temperatura de 40°C, até estabilização da umidade. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de rotor vertical. Em seguida, foi acondicionado em frasco, hermeticamente fechado, protegendo-o do ar e da radiação solar.

### 2.1.2 Preparo dos extratos

A preparação dos extratos foi realizada pela equipe do Laboratório de Fitoquímica (CCBS – UEPB). O material vegetal de TP e CQ foi submetido à extração com etanol 96% (v:v). Foram realizadas extrações num intervalo de 48h para TP e 72 horas para CQ. Os extratos foram submetidos a processo de evaporação a 50 °C, obtendo-se assim o extrato etanólico bruto (EEB).

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico, 50 g de pó de AC e 350 mL de mistura hidroalcoólica (50% v/v), foi submetida à extração por maceração por 72 h. Após esse período, o obtido foi filtrado. Para o extrato aquoso, o pó de AC foi submetido à extração aquosa a quente, usando água destilada como solvente, mantidos sob agitação (500 rpm) por 15 minutos e filtrado posteriormente. Ambos os filtrados obtidos passaram pela técnica de spray dryer (LABMAQ – MSD 0.5), o qual se deu temperatura de 100 °C. Por fim, obteve-se o extrato hidroalcoólico (EHA) e o extrato aquoso nebulizado (EAN), respectivamente.

Obteve-se, assim:

- Extrato etanólico bruto de *Cnidocolus quercifolius* (EEB-CQ)
- Extrato etanólico bruto de *Tacinga palmadora* (EEB-TP)
- Extrato hidroalcoólico de *Apodanthera congestiflora* (EHA-AC)
- Extrato aquoso nebulizado de *Apodanthera congestiflora* (EAN-AC)

## 2.2 Peçonha ofídica

O veneno de *Bothrops erythromelas* (BeV) foi obtido no Museu Vivo de Répteis da Caatinga, Puxinanã, Paraíba, Brasil, através de extração manual e então liofilizado e mantido a -20°C até o uso. A solução do veneno foi preparada em tampão fosfato salino (PBS), contendo os seguintes constituintes: NaCl 137 mM, KCl 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM e pH 7,4. A quantificação foi expressa pelo teor de proteína, determinado pelo ensaio de Bradford (1976) usando albumina como padrão.

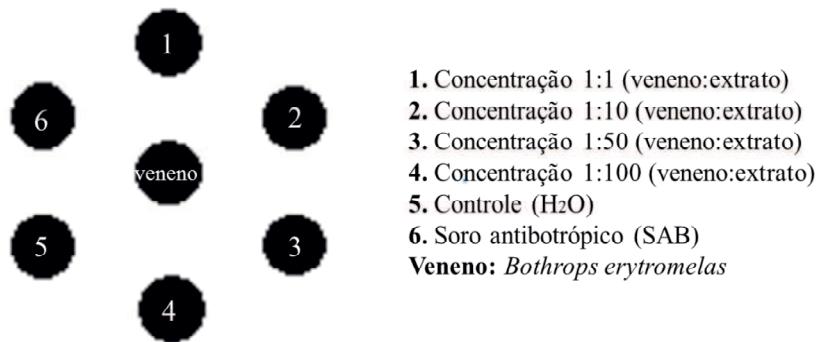
## 2.3 Ensaio enzimáticos *in vitro*

### 2.3.1 Ensaio de neutralização pelo método de Ouchterlony

O Método de Ouchterlony foi realizado para avaliar o efeito inibitório do extrato frente ao veneno. Para tal, foi preparada uma solução de agarose a 2% (m:v), distribuída em

placas de Petri, com 15mL em cada uma das placas. Após a solidificação, foram feitos sete orifícios utilizando uma ponteira, com distância de 1,5 cm entre si, sendo aplicadas as amostras a serem testadas (Figura 1), nas proporções 1:1, 1:10, 1:50 e 1:100 (veneno:extrato). As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 48 horas. Após esse período, foram lavadas com NaCl 150 mM e deixadas para secar em estufa a 37°C por 24 horas. As linhas de precipitação foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue 250-R 0,12% por 15 minutos, sendo retirado o excesso do corante por lavagens sucessivas em solução descorante (OUCHTERLONY, 1953).

**Figura 1. Esquema utilizado no teste de Ouchterlony**



Fonte: elaborado pela autora

### **2.3.2 Inibição da atividade proteolítica sobre a azocaseína**

A atividade proteolítica da peçonha foi determinada por método turbidimétrico utilizando azocaseína como substrato, conforme descrito previamente na literatura, com pequenas modificações (PEREAÑEZ et al., 2013).

Diferentes concentrações de peçonha foram pré-incubadas por 30 min a 37°C em um volume final de 100 µL. Em seguida, em cada tubo, 100 µL de azocaseína (10 µg/mL<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 200 mM e CaCl<sub>2</sub> 5 mM) foram adicionados e incubados por 90 min a 37 °C. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético a 5%. Após 30 min em repouso à 8 °C, os tubos foram centrifugados a 15.000 g por 10 min a 22 °C. O sobrenadante (100 µL) foi removido e misturado com igual volume de NaOH 0,5 M em uma microplaca de 96 poços. Após 10 min a temperatura ambiente, as amostras foram lidas a 440 nm em leitora de microplacas (Epoch-BioTek, Winooski, VT, EUA). Brancos foram preparados da mesma forma, substituindo o substrato por igual volume de tampão. Uma concentração mínima proteolítica foi definida como a

menor quantidade de peçonha capaz de produzir um aumento de 0,2 unidades de absorvância em relação ao controle no qual se incubou apenas substrato (ausência de peçonha).

Para os ensaios de inibição, a concentração mínima proteolítica (5 µg) foi pré-incubada com proporções crescentes de cada extrato (1:1, 1:10, 1:50 e 1:100) a 37°C por 30 min, e em seguida o ensaio realizado conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade proteolítica em relação ao controle em que apenas peçonha foi incubada (1:0 m/m, peçonha:extrato, considerado 100% de atividade proteolítica), como média ± erro padrão da média, com n = 3.

### **2.3.3 Inibição da atividade fosfolipase A<sub>2</sub>**

A atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> da peçonha foi determinada por método turbidimétrico utilizando gema de ovo como substrato, conforme descrito previamente na literatura, com pequenas modificações (FÉLIX-SILVA et al., 2017).

Primeiramente, a gema de ovo foi misturada com PBS na proporção 1:3 (v/v) e centrifugada a 400 rpm por 2 min a temperatura ambiente, para a partir do sobrenadante obter-se a suspensão estoque de gema de ovo. A concentração de substrato a ser utilizada nos ensaios foi determinada como aquela que daria uma absorvância de 0,6 a 925 nm, que foi uma diluição de 10% da suspensão estoque de gema de ovo em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo NaCl 200 mM e CaCl<sub>2</sub> 5 mM.

Para o ensaio, diferentes concentrações de peçonha foram pré-incubadas por 30 min a 37 °C em um volume final de 100 µL. Em seguida, 100 µL de substrato foram adicionados e incubados por 30 min a 37 °C. Passado o período de incubação, a absorvância foi lida a 925 nm, utilizando uma leitora de microplacas (Epoch-BioTek, Winooski, VT, EUA). Brancos foram preparados da mesma forma, substituindo o substrato por igual volume de tampão. Uma concentração mínima de fosfolipase A<sub>2</sub> foi definida como a menor quantidade de peçonha capaz de produzir um decréscimo de 50% da turbidez em relação ao controle em que se incubou apenas substrato (ausência de peçonha).

Para os ensaios de inibição, a concentração mínima fosfolipásica (5 µg) foi pré-incubada com proporções crescentes de cada extrato (1:1, 1:10, 1:50 e 1:100 (veneno:extrato)), a 37 °C por 30 min e, em seguida, o ensaio foi realizado conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade fosfolipásica em relação ao controle em que apenas peçonha foi incubada (1:0 m/m, peçonha:extrato,



considerado 100% de atividade fosfolipase A<sub>2</sub>), como média ± erro padrão da média, com n = 3.

### **2.3.4 Inibição da atividade hialuronidásica**

A atividade da hialuronidase da peçonha foi determinada por método turbidimétrico utilizando ácido hialurônico como substrato, conforme descrito previamente na literatura, com pequenas modificações (PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2015).

Diferentes concentrações de peçonha foram pré-incubadas por 30 min a 37 °C em um volume final de 80 µL em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo NaCl 0,15 M. Em seguida, 20 µL de substrato (0,5 µg mL<sup>-1</sup> em tampão acetato) foram adicionados e incubados por 60 min a 37°C. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 200 µL de brometo de hexadeciltrimetilamônio a 2,5% em hidróxido de sódio a 2%. Após 10 min em repouso à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 405 nm em leitora de microplacas (Epoch-BioTek, Winooski, VT, EUA). Brancos foram preparados da mesma forma, substituindo o substrato por igual volume de tampão. Uma concentração mínima hialuronidásica foi definida como a menor quantidade de peçonha capaz de produzir um decréscimo de 50% da turbidez em relação ao controle em que se incubou apenas substrato (ausência de peçonha).

Para os ensaios de inibição, a concentração mínima hialuronidásica (5 µg) foi pré-incubada com proporções crescentes de cada extrato (1:1, 1:10, 1:50 e 1:100), a 37°C por 30 min e, em seguida, o ensaio realizado conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade hialuronidásica em relação ao controle em que apenas peçonha foi incubada (1:0 m/m, peçonha:extrato, considerado 100% de atividade hialuronidase), como média ± erro padrão da média, com n = 3.

## **2.4 Análise estatística**

Todos os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Análises de variância (ANOVA) de uma via seguido de teste de Tukey foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.01 (San Diego, CA, EUA). Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

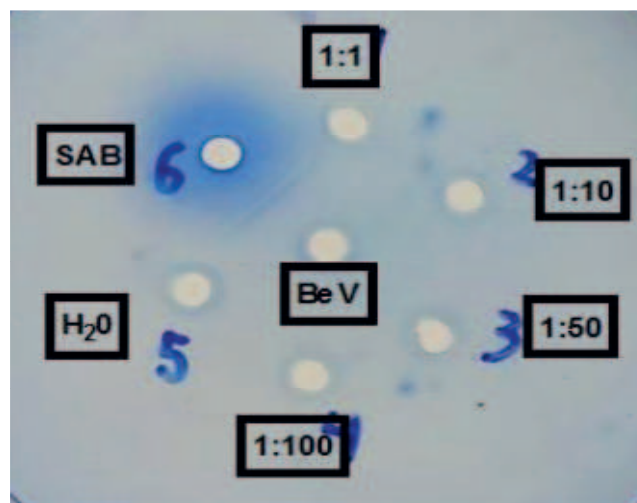
#### 3.1 Imunodifusão dupla de Ouchterlony

Para o teste de imunodifusão dupla de Ouchterlony, observou-se que não houve neutralização do veneno, utilizando os extratos de *C. quercifolius*, *A. congestiflora* e *T. palmadora*, pois não foi possível observar a formação de linhas de precipitação nas concentrações testadas para nenhum extrato (Figura 2).

O teste de imunodifusão dupla baseia-se na formação de um imunocomplexo entre dois componentes, em geral, antígeno e anticorpo, difundidos em meio sólido (FISCHER, 2007; MOLINARO, 2009). A formação de um complexo entre extrato e toxinas não foi observada, sugerindo que o ensaio de imunodifusão dupla não foi sensível, nas concentrações utilizadas para o teste. Uma hipótese a ser elencada é que esse resultado pode ter ocorrido pela baixa proporção veneno:extrato.

A concentração de ágar (2%) também pode ter ocasionado a formação de uma malha mais fina, dificultando a difusão dos componentes, visto que Felix-Silva et al. (2017) e Vejjayan, Ibrahim e Othman (2007) utilizaram 1% e 0,5%, respectivamente, tendo observado a formação dessa linha.

**Figura 2.** Teste de neutralização de atividades do veneno pelos extratos. Poço central (BeV); Poços 1-4 (extratos); 5 (controle); 6 (soro antibotrópico - SAB). Proporção veneno:extrato (p/p). Todos os extratos seguiram o mesmo padrão.



Fonte: elaborada pela autora.

### 3.2 Avaliação da atividade proteolítica sobre a azocaseína

O extrato etanólico bruto de *C. quercifolius* (EEB-CQ) causou uma diminuição na taxa de atividade proteolítica do veneno de *B. erythromelas*. A partir da concentração 1:10 (veneno:extrato m/m), com inibição de 20,59%, pôde-se observar uma diminuição gradual dessa atividade, chegando a uma taxa de inibição de 32,73% na concentração 1:50.

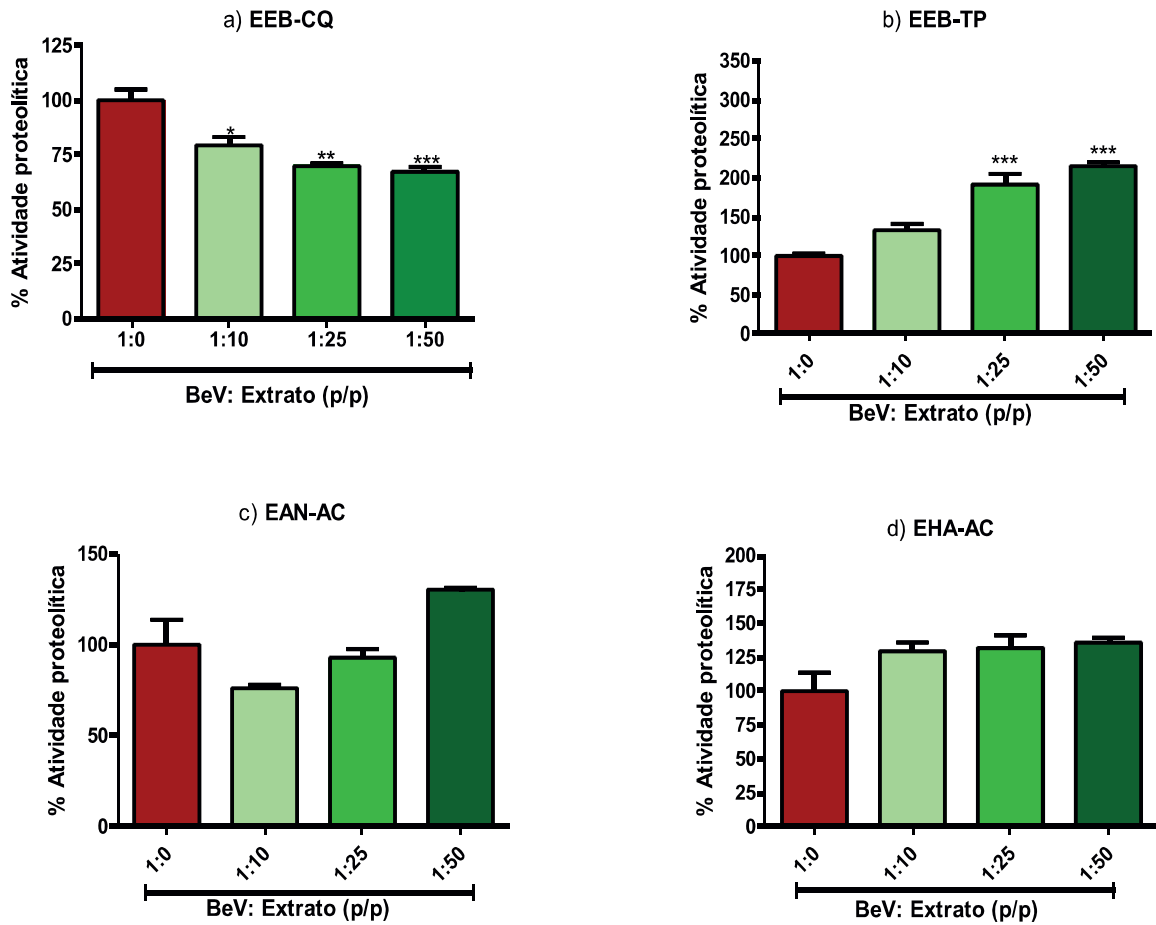
Essa inibição foi considerada significativa estatisticamente, principalmente na concentração 1:50 (m/m), com  $p < 0.001$  (figura 3a), sendo relevante pois, como observado em estudo realizado por Felix-Silva et al. (2017), o soro antibotrópico (SAB) não é capaz de neutralizar a atividade proteolítica de *B. erythromelas*. Estudos fitoquímicos do EEB-CQ realizados pela equipe do Laboratório de Fitoquímica da UEPB indicaram a presença de taninos e flavonoides no extrato.

Diversos estudos comprovam o papel dos taninos em se ligar a proteínas, podendo atuar diretamente sobre os constituintes do veneno, provocando o bloqueio competitivo dos receptores, além dos flavonoides que atuam como quelantes do íon zinco presente nas metaloproteases dos venenos ofídicos, o que pode explicar a inibição desta atividade. (MORS et al., 2000; MOURA et al., 2014; SOARES, 2005; VERRASTRO, 2018). Dessa maneira, esse extrato pode constituir um potencial produto terapêutico para o tratamento do envenenamento ofídico, que possui esta como uma das principais atividades, importante dentro do espectro dos envenenamentos botrópicos, principalmente no que diz respeito ao veneno da serpente *B. erythromelas*.

O extrato etanólico bruto de *T. palmadora* (EEB-TP) causou um aumento de atividade proteolítica, potencializando a ação do veneno, tendo uma diferença significativa a partir da concentração 1:25 (veneno:extrato m/m) (Figura 3b). A causa desse aumento não foi elucidada, baseada em dados da literatura. Entretanto, é possível relacionar tal observação à interação de componentes do extrato com proteases do veneno, atuando como cofatores e ativando-as.

Os extratos aquoso nebulizado (EAN-AC) e hidroalcoólico (EHA-AC) de *A. congestiflora* não demonstraram nenhuma inibição significativa da atividade proteolítica do veneno sobre a azocaseína, como observado nas figuras 3c e 3d. Estudos por Pinto et al. (2017) revelaram a ausência de taninos e flavonoides no extrato hidroalcoólico de *A. congestiflora*, o que pode explicar a não inibição da atividade proteolítica.

**Figura 3. Avaliação da inibição da atividade proteolítica sobre a azocaseína.** a) Extrato etanólico bruto de *C. quercifolius*. b) Extrato hidroalcoólico de *T. palmadora*. c) Extrato aquoso nebulizado de *A. congestiflora*. d) Extrato hidroalcoólico de *A. congestiflora*



Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. (n=3). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o grupo controle no teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

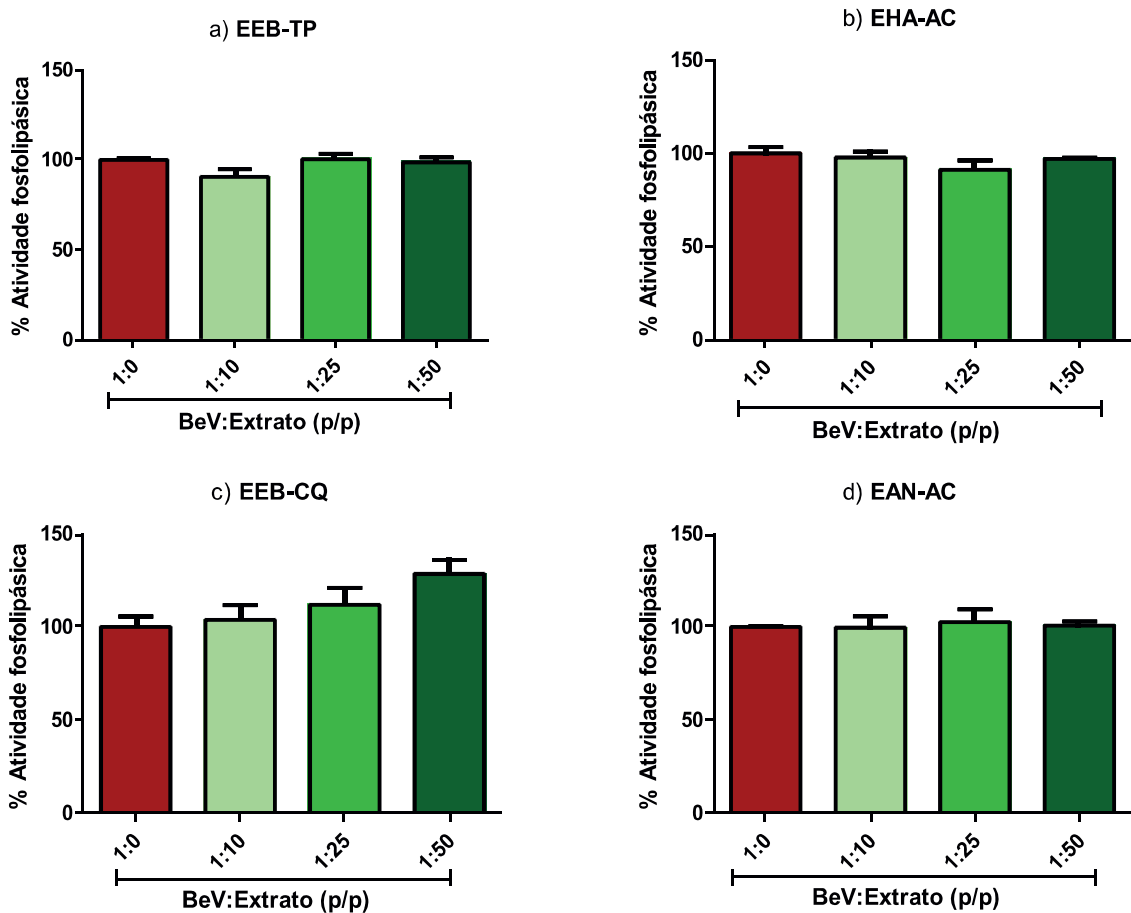
### 3.3 Avaliação da inibição da atividade fosfolipásica

De acordo com o teste realizado para avaliar a inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *B. erythromelas* pelos extratos avaliados, nenhum mostrou inibição significativa em qualquer concentração testada (Figura 4). Embora o EEB-TP tenha reduzido em 10% essa atividade (Figura 4a), tal resultado não apresentou relevância estatística ( $p > 0,05$ ).

Esse resultado foi semelhante com o estudo realizado por Felix-Silva (2014) e Maiorano (2005), que testaram o extrato de *Jatropha gossypifolia* e *Mikania glomerata*, respectivamente, contra a ação da peçonha do gênero *Bothrops*, não encontrando inibição

significativa da atividade fosfolipásica para o veneno avaliado, por essa metodologia, o que não descaracteriza a importância desses extratos como antifúngicos, visto que há outras atividades que podem ser neutralizadas. Outros métodos podem ser realizados para verificar a neutralização da atividade fosfolipásica.

**Figura 4. Avaliação da inibição da atividade fosfolipásica.** a) Extrato hidroalcoólico de *T. pamadora*. b) Extrato hidroalcoólico de *A. congestiflora*. c) Extrato etanólico bruto de *C. quercifolius*. d) Extrato aquoso nebulizado de *A. congestiflora*.



Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. (n=3). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o grupo controle no teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.4 Avaliação da inibição da atividade hialuronidásica

O EHA-AC foi capaz de inibir de forma eficiente a atividade hialuronidásica do veneno de *B. erythromelas*, promovendo uma inibição total desta atividade a partir da

concentração de 1:25 (veneno:extrato m/m) (Figura 5a). Esse resultado corrobora com estudos realizados com outras espécies, como a *Jatropha gossypifolia*, que inibiu 100% a atividade do veneno de *B. erythromelas* (FELIX-SILVA et al., 2017) e *Euphorbia hirta*, inibindo 93% da atividade do veneno de *Naja naja* (GOPI, 2016).

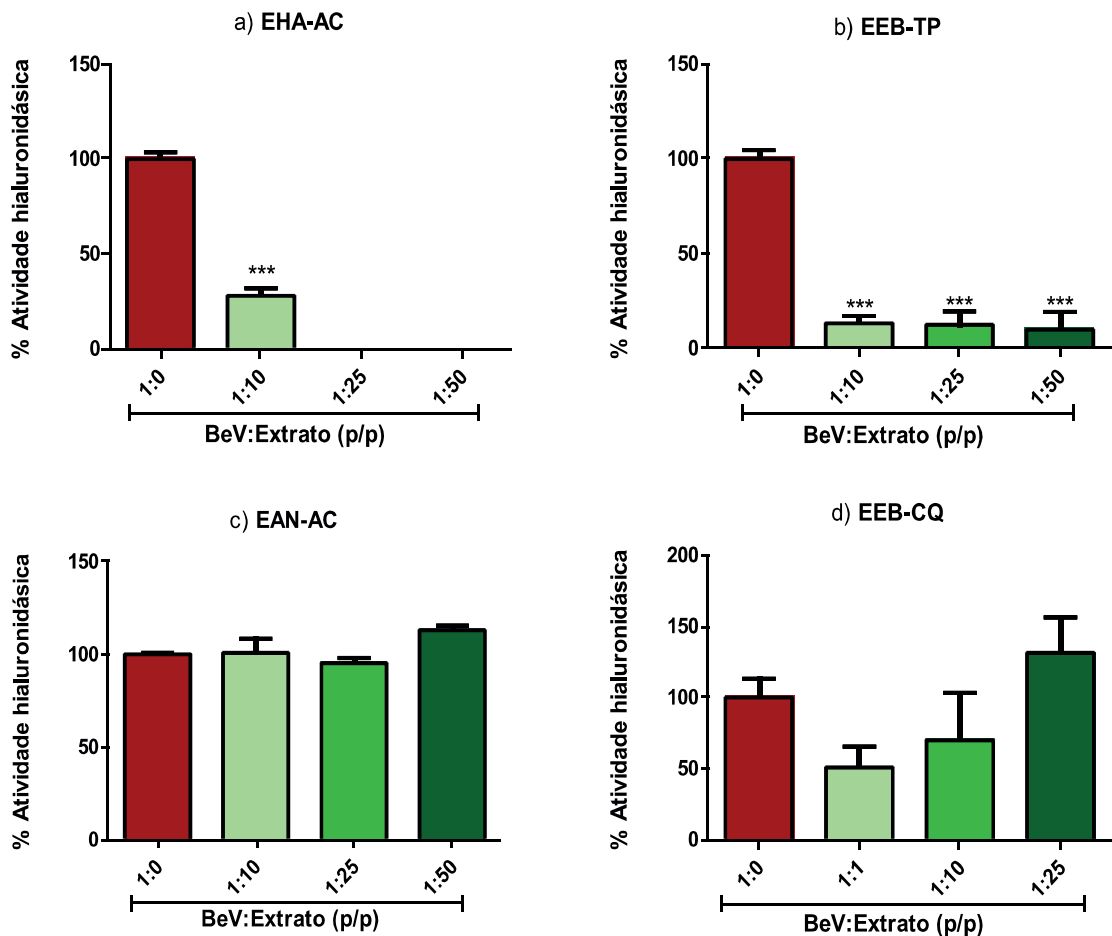
O EEB-TP mostrou inibição de até 91% da atividade hialuronidásica do veneno, na maior concentração testada (Figura 5b). Ambos os extratos mostraram uma taxa de inibição relevante. É provável que estes possam ser utilizados como fonte de produtos capazes de diminuir o dano local causado pelos envenenamentos botrópicos, visto que em estudos experimentais, a neutralização da hialuronidase por extratos vegetais inibiu o dano tecidual, retardando a difusão e os efeitos letais da peçonha (BORDON, 2012; GIRISH et al., 2004).

Estudos fitoquímicos por Pinto et al. (2017) revelaram a presença de terpenos e alcaloides no extrato EHA-AC, enquanto que o estudo fitoquímico de EEB-TP realizado pelo Laboratório de Fitoquímica da UEPB revelaram a presença de alcaloides e flavonoides. Esses componentes foram reportados por Girish et al. (2009) como inibidores de hialuronidase, o que pode explicar essa ótima taxa de inibição da atividade.

A hialuronidase é uma enzima amplamente distribuída em venenos de serpentes, sendo crucial na difusão das toxinas, potencializando a toxicidade dos venenos. Isso ocorre porque a hialuronidase catalisa a hidrólise do tecido conjuntivo e degradação do ácido hialurônico, componente da matriz extracelular, (GIRISH et al., 2002; MARQUES JUNIOR, 2014), o que deflagra o dano local. Assim, a inibição desta enzima é um fator chave no tratamento do envenenamento ofídico, podendo reduzir a velocidade de difusão das toxinas e diminuir o dano tecidual (BORDON, 2012; GIRISH et al., 2004).

O EAN-AC (Figura 5c) e o EEB-CQ (Figura 5d) não apresentaram atividade inibitória do veneno sobre a hialuronidase em nenhuma das concentrações testadas. Apesar de ser possível observar uma diminuição visual na concentração de 1:1 (figura 5d) do teste com EEB-CQ, o extrato não foi completamente diluído, restando pequenos fragmentos que interferiram na leitura da turbidez, resultando em falsos positivos e muita divergência entre as concentrações, sendo então esse resultado desconsiderado.

**Figura 5. Avaliação da atividade hialuronidásica.** a) Extrato hidroalcoólico de *A. congestiflora*. b) Extrato hidroalcoólico de *T. palmadora*. c) Extrato aquoso nebulizado de *A. congestiflora*. d) Extrato etanólico bruto de *C. quercifolius*.



Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. (n=3). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 quando comparado com o grupo controle no teste ANOVA seguido por teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

A importância do estudo dos extratos vegetais dá-se por seu uso na medicina tradicional ser indicado para diversos fins, e múltiplos estudos farmacológicos confirmam os efeitos biológicos atribuídos popularmente a essas plantas. A importância médica das plantas tem originado vários estudos etnofarmacológicos e experimentais que resultaram na descoberta de muitas propriedades vegetais interessantes. Assim, a busca por novos compostos que possam ser utilizados como suplemento à soroterapia antiofídica torna-se fundamental (MENDES et al., 2008; MOSCA, 2009; SOARES et al., 2005; VALE et al., 2011).

A serpente *B. erythromelas* possui ampla importância médica na região Nordeste, por ser responsável pela maioria dos envenenamentos ofídicos. Seu veneno não está incluso no

*pool* de venenos usados na fabricação do soro antiofídico, o que leva a uma ineficiência na neutralização de algumas atividades desencadeadas pelas toxinas desse veneno. A busca por novas alternativas para diminuir ou retardar efeitos causados por sua peçonha vem mostrando resultados positivos com diversas espécies vegetais, como a *Jatropha mollissima* (GOMES, 2015) e *J. gossypifolia* (FELIX-SILVA et al, 2017).

Embora o mecanismo de ação dos extratos testados ainda seja desconhecido, pode-se pressupor que as propriedades de neutralização ocorrem pela associação de seus componentes com toxinas do veneno (MENDES, 2008). É importante destacar que além dos testes *in vitro* de neutralização das diversas atividades do veneno de *B. erythromelas*, faz-se necessário avaliá-los frente a outras atividades biológicas, sendo importante a realização de testes *in vivo*, para que a propriedade antiofídica possa ser assegurada.

#### 4 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir, a partir da análise de inibição das atividades da peçonha, que o extrato de *Cnidocolus quercifolius* foi capaz de neutralizar cerca de 32% da atividade proteolítica de *Bothrops erythromelas*. A espécie *Tacinga palmadora* potencializou a atividade proteolítica, entretanto inibiu 91% da atividade hialuronidásica e 10% da atividade fosfolipásica. O extrato hidroalcoólico de *Apodanthera congestiflora*, inibiu 100% da atividade hialuronidásica, enquanto que seu extrato aquoso nebulizado não inibiu nenhuma atividade testada.

A complementação do soro antiofídico com antitoxinas naturais, advindas de extratos de plantas antiofídicas, como antitoxinas que inibam as atividades proteolítica, hialuronidásica e fosfolipásica, pode aumentar a capacidade do soro antiveneno em neutralizar toxinas ofídicas e melhorar o tratamento no envenenamento botrópico.

Testes *in vivo*, como atividade edematogênica, hemorrágica, inflamatória e miotóxica poderão ser feitos posteriormente para confirmar as atividades inibitórias dos testes que foram realizados *in vitro* no presente estudo, além de outras metodologias *in vitro* que podem ser aplicadas ao estudo do potencial antiofídico destes extratos. Estudos posteriores podem utilizar diferentes frações dos extratos, moléculas isoladas, outras partes das plantas, para verificar possíveis diferenças, visto a diversidade de metabólitos secundários que ocorrem em diferentes proporções frente às diversas partes da planta.



## EVALUATION OF VEGETABLE PRODUCTS IN THE INHIBITION OF THE ACTIVITIES INDUCED BY *Bothrops erythromelas* Amaral (1993) VENOM

Betsy Dantas de Medeiros<sup>†</sup>

### ABSTRACT

Snakebites represent a serious public health problem. In Brazil, *Bothrops* snakes are responsible for 90% of snakebites, and *B. erythromelas* is responsible for the largest number of the cases in the Northeast of Brazil. The bothropic venom induces multiple local and systemic effects, characterized by pain, edema, tissue necrosis, hemorrhage and coagulopathy. The antiophidic serum is the conventional antivenom used, which effectively neutralizes the systemic effects, but not the local effects. In this context, is relevant the search of complementary alternatives to serum therapy. The present study aimed to evaluate the antiophidic potentials of the extracts of the species *Apodanthera congestiflora*, *Cnidoscolus quercifolius* and *Tacinga palmadora* against *Bothrops erythromelas* venom. In vitro assays using Ouchterlony double immunodiffusion assay and turbidimetry assay method with 96 well microplate readings were performed to evaluate the inhibition of hyaluronidase, fosfolipase A2 and proteolytic activities, importants in the bothropic envenomation in 1:1, 1:10, 1:50 and 1:100 proportions (venom: extract). The results demonstrated a inhibition of 32.73% of proteolytic activity at the ratio of 1:50 (venom:extract) for *C. quercifolius*, inhibition of 100% and 91% of hyaluronidase activity for *A. congestiflora* and *T. palmadora*, respectively, and 10% inhibition of phospholipase A2 activity for *T. palmadora*. In view of the results, it can be sources of bioactive molecules with antiophidic activities against *B. erythromelas* venom and which may help in the treatment of local effects deflagrated by the bothropic envenomation.

**Keywords:** Antiophidic plants. Bothropic venom. Biological activity. Jararaca-da-seca.

---

<sup>†</sup> Graduate student in Biological Sciences at the State University of Paraíba - Campus I  
Email: betsydantas@gmail.com

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 3, p.472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- AMORIM, F. G. et al. New findings from the first transcriptome of the *Bothrops moojeni* snake venom gland. **Toxicon**, 2017.
- ANDRADE, C. T. S.; MARQUES, J. G. W.; ZAPPI, D. C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 36-42, 2006.
- ARAÚJO, R. V. S. et al. Metaloproteínases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82-88, 2011.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 36, n. 2/4, p. 480-489, 2003.
- BERNARDE, P. S. Serpentes Peçonhentas e Acidentes Ofídicos no Brasil. **São Paulo: Anolisbooks**, 2014. 224p.
- BORDON, K. C. F. **Caracterização funcional e estrutural da hialuronidase isolada da peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus***. 2012. 126 f. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica, 7. Ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2009. 816p.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**, 2001. 120p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CARDOSO, J. L. C. et al. Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: **SARVIER**, 2009. 468 p.

CARVALHO, C.M; VILAR, J.C.; FURTADO, M.F.D. Effects of the aqueous extracts of plants of the genera *Apodanthera* (Cucurbitaceae) and *Jatropha* (Euphorbiaceae) on the lethality of the venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). 2007.

COSTA, H.C; BÉRNILS, R.S. Répteis brasileiros: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira** v. 4, n. 3, 2015.

DA SILVA, Cleomária G. **Estudo etnobotânico e da atividade antimicrobiana ‘in vitro’ de plantas medicinais na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará.** 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2012.

DATASUS. Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Estatística 2016. **Ministério da Saúde.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaispb.def/>>. Acesso em 18 de março de 2018.

FÉLIX-SILVA, J. et al. Aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia* L.(Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jararaca* snake venom. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104952, 2014.

FÉLIX-SILVA, J. et al. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v. 125, p. 74-83, 2017.

FERNANDES, R. S. et al. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2011

FISCHER, G. B.; SCROFERNECKER, M. L. Imunologia Básica Aplicada. 2ªed. **Segmento Pharma**: São Paulo, 2007, p. 219-230.

GIRISH, K. S. et al. Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 240, n. 1-2, p. 105-110, 2002.

GIRISH, K. S. et al. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 193-202, 2004.

GIRISH, K. S. et al. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic Perspective. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 18, p. 2261-2288, 2009.

GOMES, L.M.A. et al. Phytochemical screening and anti-inflammatory activity of *Cnidocolus quercifolius* (Euphorbiaceae) in mice. **Pharmacognosy Research**, v.6, n.4, p.345-349, 2014a.

GOMES, L.M.A. et al. Antinociceptive activity of the ethanolic extract from barks and leaves of *Cnidocolus quercifolius* (Euphorbiaceae) in mice. **Journal of Young Pharmacists**, v.6, n.2, p. 64-69, 2014b.

GOMES, J. A.S. **Inibição dos efeitos locais induzidos pelas peçonhas das serpentes Bothrops erythromelas e Bothrops jararaca pelo extrato aquoso das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail.** 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

GOPI, K. et al. Quercetin-3-O-rhamnoside from *Euphorbia hirta* protects against snake Venom induced toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 7, p. 1528-1540, 2016.

HOLLIS, H.; SCHEINVAR, L. El interesante mundo de las cactáceas. México: **Fondo de Cultura Económica**, 1995. 235p.

JORGE, R. J. B. et al. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of proteomics**, v. 114, p. 93-114, 2015.

KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **The FEBS journal**, v. 278, n. 23, p. 4544-4576, 2011.

LUNA, K. P.O. et al. Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 731-732, 2010.

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.

MARQUES JUNIOR, A. P. et al. CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, 2014.

MELO, A.L.; SALES, M.F. O gênero *Cnidocolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Acta botânica brasileira**, v. 22, n.3, p. 806-827, 2008.

MENDES, M. M. et al. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy research**, v. 22, n. 7, p. 859-866, 2008.

MOLINARO, E. M. et al. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, v. 4. 2009.

MOSCA, V. P; LOIOLA, M. I. B. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, 2009.

MORS, W. B. et al. Plant natural products active against snake bite—the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

MOURA, V. M. et al. A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn.(Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. **Toxicon**, v. 85, p. 59-68, 2014.

MOURA, V. M.; MOURÃO, R. H. V.; SANTOS, M. C. D. Acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil e o uso de espécies vegetais como tratamento alternativo e complementar à soroterapia. **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 1, p. 2-12, 2015.

MOURA, V. M. et al. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth.(Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 183, p. 136-142, 2016.

NASCIMENTO, J. M. et al. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin–Darby canine kidney cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, n. 5, p. 591-605, 2007.

NUNES, E. A. C. **Estudo da neutralização de componentes do veneno da serpente *Bothrops erythromelas***. 2016. 46 f. Monografia (Graduação). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

OLIVEIRA, E. C. **Avaliação dos extratos vegetais de *Clusia fluminensis* planch & triana na neutralização de atividades biológicas provocadas pelo veneno de *Bothrops jararaca***. 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

OLIVEIRA, E.C.S; FERNANDES, P.D.; COSTA JUNIOR, E.O. Categorias de uso para a espécie *Cnidocolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae) no Seridó Ocidental do estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Farmacia**. v.5, n.2, 2011.

OUCHTERLONY, O. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, v. 32, p. 230-240, 1953.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D. et al. African adders: partial characterization of snake venoms from three *Bitis* species of medical importance and their neutralization by experimental equine antivenoms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003419, 2015.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Phytochemical screening and antibacterial activity of four *Cnidocolus* species (Euphorbiaceae) against standard strains and clinical isolates. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 6,n.21, p.3742-3748, 2012.

PEREAÑEZ, J. A. et al. Glycolic acid inhibits enzymatic, hemorrhagic and edema-inducing activities of BaP1, a P-I metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom: Insights from docking and molecular modeling. **Toxicon**, v. 71, p. 41-48, 2013.

PEREIRA, J. M. et al. Predição da neutralização do efeito coagulante da peçonha de *Bothrops pauloensis* pelo extrato aquoso de *Hedychium coronarium* (Zingerberaceae) através de modelos de regressão. **Bioscience Journal**., Uberlândia, v. 26, n. 6, p. 973-980, 2010.

PINTO, S. J. et al. Estudo da toxicidade aguda de extrato hidroalcoólico da raiz de *Apodanthera congestiflora*. **XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**. 2017

**REFLORA. Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 26 Mar. 2018.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I.B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

SANTOS, R. V. et al. Citrus bioflavonoid, hesperetin, as inhibitor of two thrombin-like snake venom serine proteases isolated from *Crotalus simus*. **Toxicon**, 2018.

SARTIM, M. A. et al. Moojenactivase, a novel pro-coagulant PIIIId metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, activates coagulation factors II and X and induces tissue factor up-regulation in leukocytes. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 5, 2016.

SENISE, L. V. **Avaliação dos distúrbios hemostáticos induzidos por venenos de serpentes *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperidae) adultas e filhotes e eficácia do tratamento com soro antiofídico**. 2014. 140 f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SOARES, A. M., FONTES, M.R., GIGLIO, J.R. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: function–structure relationship. **Current Organic Chemistry**. V. 8, 1677–1690, 2004.

SOARES, A. M. et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, n.22, p. 2625-2641, 2005.

TAYLOR, N.P et al. 2017. *Tacinga palmadora* (versão alterada da avaliação de 2013). **A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2017**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/46514/0>>. Acesso em 26 Mar. 2018.

UETZ, P.; FREED, P.; JIRÍ HOŠEK. **The Reptile Database** (2017). Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em 31 de janeiro de 2018.

VALE, H. F. et al. Protective effect of *Schizolobium parahyba* flavonoids against snake venoms and isolated toxins. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 20, p. 2566-2577, 2011.

VEJAYAN, J.; IBRAHIM, H.; OTHMAN, I. The potential of *Mimosa pudica* (Mimosaceae) against snake envenomation. **Journal of Tropical Forest Science**, p. 189-197, 2007.

VERRASTRO, B. R. et al. The effects of *Cissampelos pareira* extract on envenomation induced by *Bothrops diporus* snake venom. **Journal of ethnopharmacology**, v. 212, p. 36-42, 2018.

VILLALTA-ROMERO, F. et al. Discovery of small molecule inhibitors for the snake venom metalloprotease BaP1 using in silico and in vitro tests. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 9, p. 2018-2022, 2017.

VILAR, J. C.; CARVALHO, C. M.; FURTADO, M. F. D. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas. **Biologia Geral e Experimental**, v. 6, n. 1, p. 3-36, 2005.