



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ**  
**PRÓ - REITORIA DE PESQUISA, PÓS - GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA**  
**PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS INDUZIDAS POR PEÇONHAS BOTRÓPICAS**

**VALÉRIA MOURÃO DE MOURA**

**Santarém, Pa**  
**Fevereiro de 2012**

**VALÉRIA MOURÃO DE MOURA**

**EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS INDUZIDAS POR PEÇONHAS BOTRÓPICAS**

**ORIENTADORA: DRA. ROSA HELENA VERAS MOURÃO**

**CO-ORIENTADOR: DR. JOACIR STORLAZ DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Recursos Naturais da Amazônia, junto ao Programa de Pós - Graduação *Strictu Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia

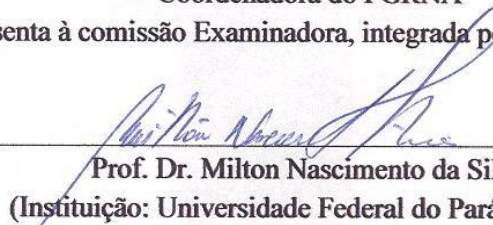
**Santarém, Pará  
Fevereiro de 2012**

## EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS INDUZIDAS POR PEÇONHAS BOTRÓPICAS

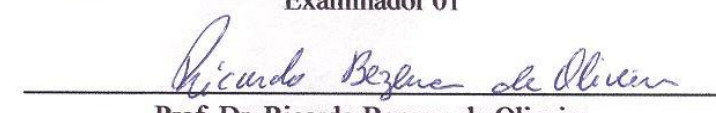
Esta dissertação foi julgada e adequada para obtenção do Título de Mestre em Recursos Naturais, Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós - Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia - PGRNA, nível mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em 24 de fevereiro de 2012.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosa Helena Veras Mourão (UFOPA)  
Coordenadora do PGRNA

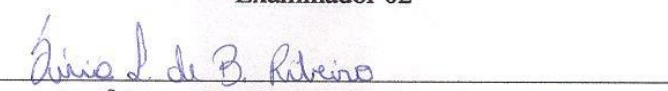
Apresenta à comissão Examinadora, integrada pelos professores:

  
Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva  
(Instituição: Universidade Federal do Pará - UFPA)

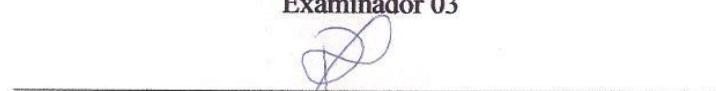
Examinador 01

  
Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira  
(Instituição: Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA)

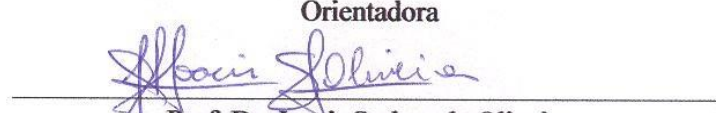
Examinador 02

  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Sírnia Lisandra de Barcelos Ribeiro  
(Instituição: Faculdades Integradas do Tapajós - FIT)

Examinador 03

  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosa Helena Veras Mourão  
(Instituição: Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA)

Orientadora

  
Prof. Dr. Joacir Stolarz de Oliveira  
(Instituição: Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA)

Co-orientador

Santarém, fevereiro, 2012

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca Ruy Barata/UFOPA**

---

- M929e Moura, Valéria Mourão de  
Efeitos de extratos vegetais sobre atividades biológicas induzidas por peçonhas  
botrópicas / Valéria Mourão de Moura. – Santarém, 2012.  
97 f.: il; 30 cm.  
Inclui bibliografias.
- Orientador Rosa Helena Veras Mourão; Co-orientador Joacir Stolarz de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-  
Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Santarém, 2012.
1. Plantas medicinais – Amazônia. 2. *Bellucia dichotoma* (Muúba). 3. Serpente – *Bothrops atrox* (Jararaca-do-norte). 4. Serpente – *Bothropoides jararaca*. 5. Medicina popular – Amazônia. 6. Farmacologia. I. Mourão, Rosa Helena Veras, orient. II. Título.

CDD: 21. ed. 615.321

---

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Heloiza Mourão e Luís Marques por serem meu porto seguro, pelo amor, carinho incondicional e as minhas irmãs Bruna, Vanessa e Fernanda por acreditarem sempre nos meus esforços.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela força nessa caminhada, por estar sempre presente em minha vida.

À minha orientadora prof<sup>a</sup>. Dra. **Rosa Mourão**, pela confiança e ensinamentos. Por ter me apresentado um mundo novo e fascinante: o mundo científico. Obrigada por acreditar no meu trabalho, pelos puxões de orelha, pelo incentivo, conhecimento repassado, pelas lições de vida, pela força que sempre me passou mesmo quando parecia impossível. Por ser um exemplo de vida que escolhi seguir. A você minha tamanha e eterna gratidão!

Ao meu co-orientador prof. Dr. **Joacir Storlaz**, pelos preciosos ensinamentos repassados, por ser um exemplo de disciplina, pelas valiosas correções e contribuições ao trabalho. Muito obrigada!

Ao prof. Dr. **Ricardo Bezerra**, pelo conhecimento repassado, valioso apoio com os animais do Biotério e contribuição no dia-a-dia do laboratório.

Ao prof. MSc. **Hipócrates Chalkidis**, pelo apoio nas coletas de serpentes, pelos valiosos ensinamentos sobre ecologia, taxonomia, métodos de coletas. Obrigada.

Aos profs. **Syane Liberal** e **Domingos Luiz**, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA/Campus Oriximiná, pelos animais cedidos para complementação dos experimentos.

À Dra. **Ana Maria Moura da Silva** do Instituto Butantan, pela ajuda na implementação de metodologias para o desenvolvimento deste trabalho e apoio ao nosso grupo de pesquisa. Em especial a **Sâmela** e **Leijianne**, pela ajuda nos experimentos e divulgação do conhecimento.

Ao prof. Dr. **Milton Nascimento** do Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – LABCROL, por ceder gentilmente seu laboratório para realização da parte fitoquímica, e por me apresentar o magnífico mundo da Química de Produtos Naturais.

À prof<sup>a</sup>. Dra. **Kelly Christina**, pela valiosa contribuição na discussão e interpretação dos dados fitoquímicos, pelo companheirismo e amizade. Muito obrigada!

À prof<sup>a</sup>. Dra. **Elaine Cristina Pacheco de Oliveira** por facilitar o contato com a Embrapa Amazônia Oriental/Belém, para identificação das espécies. Obrigada.

A todos os membros do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental-LabBBE, **Adrielle**, **Ana Paula**, **Celyane**, **Irislene Pereira**, **Márcia**, **Thuanny**, **Sandra Sarrazin** e **Suzane**. Por proporcionarem um ambiente agradável de pesquisa científica. Em especial **Leomara Andrade**, pela ajuda nos experimentos e **Juliana Raposo**, por toda ajuda durante a realização deste trabalho, pela sua dedicação, profissionalismo, e por além de tudo proporcionar um ambiente organizado para realização dos nossos trabalhos.

A **Larissa**, **Helder**, **Phablo** do Laboratório de Pesquisas Zoológicas-LPZ, pela ajuda nas coletas de serpentes, extração da peçonha. E ao **Roniclebsson** que além da ajuda no campo, é um grande amigo.

A família “LABICROIANA”, que muito contribuiu para realização desse trabalho. Em especial a **Sônia Pamplona, Consuelo Yumiko, Geysel Sampaio, Manolo Freitas, Dayani Lima, Meire, Danila Alves, Carol “A e B”, Daughlish e Neto.**

À Central de Extração em nome do prof. Dr. **Alberto Arruda**, por ceder seu laboratório para complemento dos dados fitoquímicos, em especial **Jesiel e Débora.**

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia – PGRNA, Em especial **Lauro Barata, Antônio Carlos Lola, Troy Beldini, Rodrigo Fadini, Keid Nolan e Reinaldo**, pelo conhecimento adquirido.

Aos meus pupilos, **Daniel Sussuarana e Joanderson Martins**, pela grande ajuda nas coletas, nos experimentos, e em todo o decorrer do trabalho.

À **Luciana Sousa**, por toda ajuda nos experimentos, nas coletas, na manutenção do Biotério, pelo incentivo, confiança, pelos conselhos quando eu mais precisava. Por ser minha “irmã de pesquisa” e de coração.

À **Elenn Aranha**, pela valiosa ajuda nos testes de edema de pata. Pelo companheirismo e incentivo. A **Aline Evangelista**, pelo companheirismo na manutenção do Biotério, pela participação no levantamento etnobotânico das plantas antiofídicas e por sempre me apoiar.

A todos os colegas de mestrado turma 2010 e 2011 o qual tive a honra de ser sua representante estudantil, pela troca de conhecimento, idealismo, união. Por ser uma turma de força, de raça. Em especial **Diana, Wilderclay, Paulinho, Helton e Fábio**, pelo companheirismo e cumplicidade durante esses dois anos. Muito obrigada.

Aos amigos especiais conquistados em Belém, **Heriberto, Fernanda, Rodrigo, Bruno**, pelo apoio e moradia durante realização da parte experimental do trabalho. Em especial ao **Cláudio Monteiro**, pelo companheirismo, carinho, apoio e paciência quando eu mais precisava.

Às meninas da Biologia 2005 da UFPA, **Andréia Sousa, Carina Leal, Evelane, Nayanna Yared, Wânia Cristina**, pela força e incentivo no decorrer desses dois anos.

Ao senhor **Reinaldo** da comunidade São Pedro, um dos principais motivadores para realização dessa pesquisa. Por transmitir seus conhecimentos a respeito das plantas medicinais antiofídicas. Obrigada!

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq, à Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica da UFOPA pelo apoio financeiro e possibilidade de realização desse trabalho.

Meu agradecimento e respeito aos **Animais do Biotério**, que doaram a vida à pesquisa.

Enfim, a **todos** que de uma forma ou de outra contribuíram para realização deste trabalho. **OBRIGADA.**

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que triste os caminhos, se não fora  
A mágica presença das estrelas!”*

*Mário Quintana (Das Utopias)*



## RESUMO

MOURA, Valéria. **Efeitos de extratos vegetais sobre atividades biológicas induzidas por peçonhas botrópicas**. 2012. 97p. Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA. Santarém, 2012.

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades medicinais, propagadas por usuários ou comerciantes. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes. Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo verificar as ações de plantas indicadas popularmente como antiofídicas pela população de Santarém-PA, frente à peçonha bruta de serpentes botrópicas como modelo experimental. A fim de conhecer as plantas usadas como antiofídicas pela população de Santarém, primeiramente foi realizado um estudo etnobotânico nas comunidades São Pedro, Cucurunã, Alter do Chão e mercado central de Santarém. Foram citadas 24 plantas de uso antiofídico distribuídas em 22 diferentes famílias, das quais 12 plantas (*Bellucia dichotoma*, *Aniba fragrans*, *Annona montana*, *Connarus favosus*, *Justicia* sp., *Plathymenia reticulata*, *Philodendron megalophyllum*, *Cassia fistula*, *Libidibea ferrea*, *Crateva benthami*, *Kalanchoe brasiliensis* e *Dipterix odorata*), foram mais citadas pelos entrevistados. As 12 plantas após identificação taxonômica tiveram o perfil fitoquímico traçado e foram testadas quanto ação antiofídica frente a hemorragia causada pela peçonha bruta de *Bothropoides jararaca*. Os extratos de *B. dichotoma*, *C. favosus*, *P. reticulata* e *P. megalophyllum* apresentaram várias classes de metabólitos secundários, dentre eles a presença de cumarinas, flavonóides, ácidos graxos, antraquinonas e terpenos e foram capazes de inibir completamente a hemorragia causada pela peçonha bruta de *B. jararaca*. As cinco espécies (*P. reticulata*, *C. favosus*, *A. fragrans*, *P. megalophyllum* e *B. dichotoma*) também foram avaliadas frente as atividades hemorrágica, fosfolipásica, coagulante e edematogênica induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox*. O extrato *B. dichotoma* inibiu 100% todas as atividades avaliadas. Desta forma, foi desenvolvido um método para isolamento dos principais constituintes químicos de *B. dichotoma*. No momento pode se propor que o extrato aquoso de *B. dichotoma* possui potentes propriedades neutralizadoras de peçonhas brutas de serpentes botrópicas. Porém, ainda não é possível inferir qual o constituinte ou sinergismos entre as classes presente neste extrato é responsável pela inibição observada.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais, peçonha, *Bothrops atrox*, *Bothropoides jararaca*.

## ABSTRACT

MOURA, Valéria. **Efeitos de extratos vegetais sobre atividades biológicas induzidas por peçonhas botrópicas**. 2012. 97p. Dissertação de mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA. Santarém, 2012.

In Brazil, medicinal plants of native flora are consumed with little or no proof of its medicinal properties, propagated by users or dealers. The researchers conducted to evaluate the safe use of medicinal plants and phytomedicines in Brazil are still incipient. In this context, this paper aimed to verify the actions of plants popularly indicated as antiophidic by population of Santarém-PA, compared to the crude venom of snakes of the genus *Bothrops* as an experimental model. In order to identify the plants used as antiophidics by the population of Santarém-PA, was first conducted an ethnobotanical study at communities São Pedro, Cucurunã, Alter do Chão and central market of Santarém. 24 plants were cited for use in snakebite distributed among 22 different families, of which 12 plants (*Bellucia dichotoma*, *Aniba fragrans*, *Annona montana*, *Connarus favosus*, *Justicia* sp., *Plathymenia reticulata*, *Philodendron megalophyllum*, *Cassia fistula*, *Libidibea ferrea*, *Crateva benthami*, *Kalanchoe brasiliensis* and *Dipterix odorata*) were most frequently mentioned by respondents. The 12 plants had the phytochemistry stroke after the identification and were tested for action against anti-venom serum hemorrhage caused by crude venom of *Bothropoides jararaca*. The extracts of *B. dichotoma*, *C. favosus*, *P. reticulata* and *P. megalophyllum* presented several classes of secondary metabolites, including the presence of coumarins, flavonoids, fatty acids, anthraquinones and terpenes and were able to completely inhibit hemorrhage caused by crude venom of *B. jararaca*. The five species (*P. reticulata*, *C. favosus*, *A. fragrans*, *P. megalophyllum* and *B. dichotoma*) were also evaluated against hemorrhagic activity, phospholipase, coagulant and edema induced by venom of *Bothrops atrox*. The extract *B. dichotoma* inhibited 100% all the activities evaluated. Thus, a method was developed to isolate the chemical constituents of *B. dichotoma*. At present can be proposed that the aqueous extract of *B. dichotoma* has potent neutralizing properties of crude snake venoms of the genus *Bothrops*. However, it is not possible to infer which the constituent or synergisms between the classes present in this extract is responsible for the inhibition observed.

**keywords:** Medicinal plants, venom, *Bothrops atrox*, *Bothropoides jararaca*.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS ..	xiv
LISTA DE FIGURAS ..	xv
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS ..	xviii
1 INTRODUÇÃO GERAL ..	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..	3
1.1.1 Ofidismo no Brasil ..	3
1.1.2 Características das serpentes botrópicas ..	5
1.1.3 Peçonha botrópica ..	7
1.1.4 Soroterapia ..	8
1.1.5 Plantas medicinais antiofídicas: tratamento alternativo e complementar à soroterapia tradicional ..	10
1.1.6 <i>Plathymenia reticulata</i> Benth ..	11
1.1.7 <i>Connarus favosus</i> Planch ..	13
1.1.8 <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn ..	14
1.1.9 <i>Philodendron megalophyllum</i> Schott ..	15
1.1.10 <i>Aniba fragrans</i> Ducke ..	16
2. OBJETIVOS ..	18
2.1 Objetivo geral ..	18
2.2 Objetivos específicos ..	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..	19
CAPÍTULO I ..	25
INTRODUÇÃO ..	28
MATERIAL E MÉTODO ..	29
Levantamento etnobotânico, coleta e identificação do material vegetal ..	29
Preparo dos extratos vegetais ..	30
Perfis cromatográficos dos extratos vegetais ..	30
Animais e peçonha ..	31
Inibição da peçonha ..	32
Atividade hemorrágica ..	32
Determinação do diâmetro médio da lesão hemorrágica ..	32
Análise estatística ..	33

RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
Levantamento etnobotânico.....	33
Perfis cromatográficos dos extratos .....	37
Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>B. jararaca</i> .....	41
AGRADECIMENTOS .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
CAPÍTULO II.....	46
INTRODUÇÃO.....	48
MATERIAL E MÉTODOS.....	49
Coleta e identificação do material vegetal.....	49
Preparo dos extratos aquosos (EAs) .....	49
Animais e peçonha.....	50
Protocolo de inibição da peçonha .....	50
Atividade hemorrágica.....	51
Determinação do diâmetro médio da lesão hemorrágica.....	51
Atividade Fosfolipásica (PLA <sub>2</sub> ).....	52
Atividade Coagulante .....	52
Atividade edematogênica.....	53
Análise Estatística.....	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
Inibição da atividade hemorrágica .....	53
Inibição da atividade fosfolipásica.....	58
Inibição da atividade coagulante.....	58
Inibição da atividade edematogênica.....	59
AGRADECIMENTOS .....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
CAPÍTULO III .....	65
INTRODUÇÃO.....	67
MATERIAL E MÉTODOS.....	68
Parte Experimental .....	68
Reagentes e materiais.....	68
Coleta e identificação do material botânico.....	68
Preparo do extrato aquoso da casca de <i>B. dichotoma</i> .....	68

Pré-tratamento da amostra para o perfil cromatográfico .....	68
Instrumentação e condições cromatográficas de análise .....	68
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
Perspectivas.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
SÍNTESE INTEGRADORA.....	75
ANEXOS.....	76

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1:</b> Casos de acidentes ofídicos registrados por Estados da Região Norte.....	5
---	---

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1:</b> Plantas antiofídicas citadas pelos moradores das comunidades de São Pedro, Cucurunã, Alter do Chão e Mercado de plantas de Santarém-PA.....	34
--	----

<b>Tabela 2:</b> Detecção de classes de substâncias químicas presentes nos extratos de diferentes espécies pelo método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	40
--	----

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1:</b> Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	55
--	----

<b>Tabela 2:</b> Inibição da atividade coagulante da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	59
---	----

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1:</b> Estimativa do % do solvente B para eluição isocrática, baseada no tempo de retenção da última banda $t_{rz}$ do gradiente inicial.....	72
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1:</b> Distribuição dos acidentes ofídicos por estados e regiões.....	4
<b>Figura 2:</b> Esquema das características das serpentes do grupo botrópica.....	6
<b>Figura 3:</b> Serpente <i>Bothrops atrox</i> coletada na Floresta Nacional do Tapajós-Santarém-PA.....	7
<b>Figura 4:</b> Serpente <i>Bothropoides jararaca</i> Foto: Júlio Murilo.....	7
<b>Figura 5:</b> Aspectos gerais de <i>Plathymenia reticulata</i> Benth.....	12
<b>Figura 6:</b> Aspectos gerais de <i>Connarus favosus</i> Planch.....	13
<b>Figura 7:</b> Aspecto geral de <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn.....	15
<b>Figura 8:</b> <i>Philodendron megalophyllum</i> Schott.....	16
<b>Figura 9:</b> Aspectos gerais de <i>Aniba fragrans</i> Ducke.....	17

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1:</b> Percentual das espécies mais citadas como sendo antiofídica pelos moradores onde foram aplicados os questionários.....	35
<b>Figura 2:</b> Número de espécies antiofídicas por família botânica, citadas nas comunidades.....	35
<b>Figura 3:</b> Número de citações das partes das plantas utilizadas para o preparo dos remédios caseiros.....	36
<b>Figura 4:</b> Número de citações do modo de uso das plantas utilizadas para o preparo dos remédios caseiros.....	36
<b>Figura 5:</b> Cromatograma das 15 amostras. Sistema apolar fotografado em luz visível e derivatizado com VAS.....	38
<b>Figura 6:</b> Cromatograma das 15 amostras. Sistema polar fotografado em luz visível e derivatizado com VAS.....	38
<b>Figura 7:</b> Cromatograma das 15 amostras. Sistema média polaridade fotografado em luz visível e derivatizado com VAS.....	38
<b>Figura 8:</b> Cromatograma das 15 amostras. Sistema polar básico fotografado em luz visível e derivatizado com VAS.....	39
<b>Figura 9:</b> Cromatograma das 15 amostras. Sistema polar básico fotografado em luz	

visível e derivatizado com KOH.....	39
<b>Figura 10:</b> Cromatograma das 15 amostras. Sistema polar básico fotografado em luz visível e derivatizado com NP-PEG.....	39
<b>Figura 11:</b> Efeito neutralizador de extratos vegetais contra atividade hemorrágica causada pela peçonha de <i>Bothropoides jararaca</i> .....	42

## CAPÍTULO II

<b>Figura 1:</b> Atividade hemorrágica da peçonha de <i>B. atrox</i> .....	55
<b>Figura 2:</b> Efeito neutralizador do extrato aquoso da casca de EABd ( <i>B. dichotoma</i> )...	56
<b>Figura 3:</b> Efeito neutralizador de extratos vegetais contra atividade hemorrágica causada pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	56
<b>Figura 4:</b> Atividade hemolítica indireta da peçonha bruta de <i>B. atrox</i> .....	57
<b>Figura 5:</b> Efeito neutralizador de EAs contra atividade edematogênica causada pela peçonha de <i>B. atrox</i> .....	61

## CAPÍTULO III

<b>Figura 1:</b> Perfil cromatográfico do extrato aquoso da casca de <i>B. dichotoma</i> .....	71
<b>Figura 2:</b> Cromatograma do extrato das cascas de <i>B. dichotoma</i> 22% de ACN.....	72
<b>Figura 3:</b> Cromatograma do extrato aquoso das cascas de <i>B. dichotoma</i> (78:22 H <sub>2</sub> O:ACN acidificado com 1% ácido fórmico).....	73
<b>Figura 4:</b> Cromatograma do extrato aquosos das cascas de <i>B. dichotoma</i> (H <sub>2</sub> O:ACN 73:17 acidificado 1% ácido fórmico).....	73



## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CONAFIT = Subcomissão Nacional de Assessoramento em Fitoterápicos

DMH = Dose mínima hemorrágica

DME = Dose mínima edematogênica

DMC = Dose mínima coagulante

DMHi = Dose mínima hemolítica indireta

EABd = Extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*

EAPr = Extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*

EAPm = Extrato aquoso de *Philodendron megalophyllum*

EAAf = Extrato aquoso de *Aniba fragrans*

EACf = Extrato aquoso de *Connarus favosus*

EAs = Extratos aquosos

EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FUNASA = Fundação Nacional de Saúde

FUNED = Fundação Ezequiel Dias

FIT = Faculdades Integradas do Tapajós

HMS = Hospital Municipal de Santarém

IVB = Instituto Vital Brasil

IBU = Instituto Butantan

MS = Ministério da Saúde

OMS = Organização Mundial de Saúde

PLA<sub>2</sub> = Fosfolipase A<sub>2</sub>

PEMATEC = Empresa de Peças e Materiais Tecnológicos

p:v = peso:volume

SINAN = Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVMP = Metaloproteinases de zinco dependente (snake venom metalloproteinases)

SVS = Secretária de Vigilância em Saúde

UEPA = Universidade Federal do Pará

°C = Graus Celsius

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os acidentes ofídicos são considerados um problema de saúde pública tanto pela sua incidência, quanto pela intensidade com que as peçonhas atuam nos organismos vivos. A maioria destes acidentes ocorre com vítimas oriundas da zona rural, as picadas são geralmente nos membros inferiores e superiores estando relacionados com fatores climáticos e o aumento da atividade antrópica (PINHO E PEREIRA, 2001). No Brasil, foram notificados cerca de 190.000 acidentes ofídicos no período de 2000 a 2007, sendo cerca de 90% causados por serpentes do gênero *Bothrops* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007). O envenenamento por serpentes botrópicas desencadeia uma série de ações locais e sistêmicas em suas vítimas (BORGES *et al.*, 1996).

O quadro clínico desenvolvido pela vítima pode ser muito variado, dependendo da quantidade de peçonha inoculada, localização da picada, idade da vítima e principalmente do tempo decorrido do acidente e o atendimento médico. Na região norte do Brasil, o problema é agravado devido às longas distâncias existentes entre os locais de ocorrência do acidente e o atendimento médico, dessa forma, os pacientes demoram a receber o tratamento soroterápico específico (DOS-SANTOS, 1995; BORGES *et al.*, 1996). Neste contexto, diversas práticas populares têm sido empregadas nos casos de envenenamentos por serpentes, dentre as quais, a mais utilizada são as plantas medicinais, como coadjuvantes à soroterapia ou como medicamento alternativo aplicado na falta de recursos soroterápicos (OTERO, 2000; MORS *et al.*, 2000; CARDOSO, 2003).

Os preparados contra envenenamentos ofídicos possuem as mais diversas misturas, porém todas têm plantas como constituintes. Um dos mais famosos contravenenos é o Específico Pessoa, fabricado em Sobral, no Ceará, elaborado com a raiz de uma planta conhecida como cabeça-de-negro. Nakagawa e colaboradores (1982) isolaram as cabenegrinas I e II desta planta, relatando que estes compostos têm propriedades antiofídicas, porém eles omitiram a espécie, citando apenas o nome popular. O contraveneno Pau X, produzido no Pará, é indicado para envenenamentos de serpentes e também para escorpiões.

Muitas destas plantas estão identificadas, porém a maioria nunca foi estudada para verificar suas ações e validar os usos, as quais são indicadas somente pelos nomes populares. O problema do reconhecimento das plantas pelos nomes populares é que estes variam de região para região, dificultando ainda mais os estudos científicos.

Em 1998 foi criada a Subcomissão Nacional de Assessoramento em Fitoterápicos – CONAFIT, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde - ANVISA. A CONAFIT recomenda que sejam realizados estudos sobre as plantas medicinais regionais utilizadas popularmente, como forma de validar o uso das plantas e proteger o patrimônio genético deste recurso natural (BRASIL, 1999). Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo verificar a ação de extratos de plantas usadas na medicina popular como antiofídica pela população da região de Santarém - Pará frente à peçonhas botrópicas.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia da Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA. A dissertação foi dividida em: **REVISÃO DA LITERATURA** sobre os aspectos do ofidismo no Brasil, características das serpentes e peçonhas botrópicas, soroterapia e uma revisão sobre plantas medicinais utilizadas como antiofídicas. A literatura sobre as plantas medicinais aborda ainda as espécies que apresentaram melhor resultado: *Plathyenia reticulata* Benth, *Conarus favosus* Planch, *Bellucia dichotoma* Cogn, *Philodendron megalophyllum* e *Aniba fragrans* Ducke, seguida de **OBJETIVOS** geral e específicos. **A METODOLOGIA** e **RESULTADOS** foram apresentados em forma de artigos divididos em três capítulos. **Capítulo 1** - Estudo etnobotânico, químico e atividade antihemorrágica de extratos vegetais utilizados como neutralizantes da ação da peçonha de *Bothropoides jararaca* (artigo escrito de acordo com as normas da revista *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*); **Capítulo 2** - Ação antiofídica de extratos vegetais contra a peçonha bruta de *Bothrops atrox* (artigo escrito de acordo com as normas da revista *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*) e o **Capítulo 3** - Desenvolvimento de um método por HPLC-DAD para isolamento dos constituintes majoritários do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* Cogn (Melastomataceae) (artigo escrito de acordo com as normas da revista *Química nova*, em preparação).

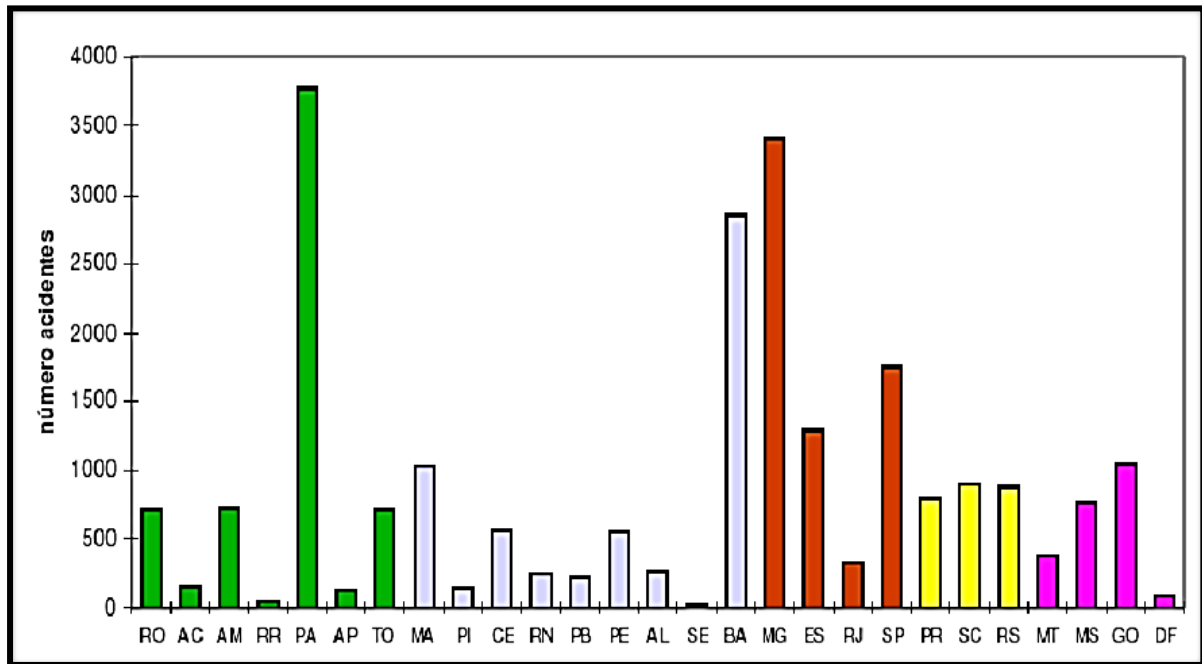
## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 Ofidismo no Brasil

As serpentes peçonhentas existentes no Brasil pertencem as famílias: Elapidae onde o único gênero desta família no Brasil é o *Micrurus*, cujas espécies são conhecidas por corais (BRASIL, 2003); e Viperidae, na qual estão inseridas os gêneros *Crotalus* (cascavel, boicininga), gênero *Lachesis* (surucuru, surucutinga) e as serpentes do grupo botrópico que estão atualmente distribuídas em cinco gêneros: *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis* (jararacas) (FENWICK *et al.*, 2009).

Essas serpentes são responsáveis por cerca de 20.000 acidentes ofídicos causados anualmente em todo Brasil (ARAÚJO *et al.*, 2003). O perfil epidemiológico do ofidismo demonstra que as principais vítimas são indivíduos do sexo masculino, trabalhadores rurais na faixa etária de 15 a 49 anos e a letalidade geral é de 0,45% (ARAÚJO *et al.*, 2003; BOCHNER *et al.*, 2003). Do total de ofidismo no Brasil, 90% dos acidentes são botrópicos (letalidade de 0,31%), seguido dos crotálicos 7,7%, (1,87% de letalidade), laquéticos 1,4% (0,95% de letalidade) e elapídicos 0,4% (0,52% de letalidade) (ARAÚJO *et al.*, 2003). Apesar do índice baixo de letalidade há um grande índice de sequelas deixado por estes acidentes (PINHO E PEREIRA, 2001).

A ocorrência dos acidentes ofídicos está, em geral, relacionada a fatores climáticos e aumento da atividade humana nos trabalhos de campo (KOH *et al.*, 2006). A distribuição dos acidentes ofídicos no país indica maior incidência nas regiões Centro-Oeste e Norte, apesar do número absoluto de casos ser maior na região Sudeste (figura 1). Estes acidentes apresentam uma sazonalidade na qual têm predomínio nos meses quentes e chuvosos. No entanto, na região Norte, não se observa um período crítico, ocorrendo os acidentes uniformemente durante todos os períodos do ano, de acordo com resultados obtidos pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).



**Figura 1:** Distribuição dos acidentes ofídicos por estados e regiões (verde: Norte; azul: Nordeste; marrom: Sudeste; amarelo: Sul; rosa: Centro-oeste). Fonte: Manual de Tratamento e Diagnóstico de Acidentes por Animais Peçonhentos, FUNASA, 2001.

Na região Norte do Brasil ocorre a segunda maior incidência de acidentes ofídicos do país (24/100.000 habitantes), sendo inferior apenas em relação a região Centro-Oeste (33/100.000 habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; PINHO E PEREIRA, 2001). Apesar do elevado número de casos, na Amazônia brasileira ainda são poucos os estudos sobre acidentes ofídicos (PARDAL *et al.*, 1995; CARVALHO E NOGUEIRA, 1998; NASCIMENTO, 2000).

No Amazonas, o maior dos estados brasileiros, a mortalidade de 1% associada aos acidentes ofídicos é mais alta (DOS-SANTOS *et al.*, 1995; BORGES *et al.*, 1999) que a média nacional de 0,4% (Ministério da Saúde, 2001; BOCHNER E STRUCHINER, 2003) e o problema da subnotificação é agravado porque grandes distâncias são percorridas apenas por via fuvial, havendo diversas localidades com um perfil epidemiológico pouco ou nada conhecido (BORGES *et al.*, 1999).

O Pará é o Estado da região norte onde mais ocorrem este tipo de acidente, sendo registrados 54.737 casos, no período de 2000 à 2011 (tabela 1) de acordo com dados do Ministério da Saúde (2011). O número de óbitos foi de 246, aproximadamente 51% dos 401 registros da região, sendo o estado brasileiro com maior mortalidade relacionada aos acidentes ofídicos no referido período (de acordo com informações disponíveis no Sistema de Informação Sobre Agravos Notificados – SINAN 2011).

**Tabela 1:** Casos de acidentes ofídicos registrados por Estados da Região Norte.

Região/UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<b>Norte</b>	2.770	4.092	5.541	7.029	7.564	8.643	8.679	7.914	9.846	9.977	10.616	7.211
Rondônia	298	418	536	756	674	693	600	491	421	288	404	259
Acre	104	100	173	205	241	323	334	300	404	324	497	279
Amazonas	311	274	616	943	1.384	1.745	1.717	1.332	1.457	1.354	1.360	819
Roraima	12	30	103	78	179	226	320	296	184	275	189	95
Pará	1.632	2.736	3.300	4.113	4.100	4.596	4.677	4.526	6.349	6.853	6.901	4.954
Amapá	15	9	78	182	242	247	265	247	258	222	312	156
Tocantins	398	525	735	752	744	813	766	722	773	661	953	649

Casos de acidentes por serpentes (Adaptado de SINAN, SVS, MS, dados disponíveis até 02-01-2012).

De todos os municípios do Estado do Pará, Santarém se destaca por apresentar o maior número de notificações de acidentes com animais peçonhentos, com uma média de 300 casos por ano, no período de 2001 a 2003, e um índice de ocupação de 20% dos leitos do Hospital Municipal de Santarém (HMS), sendo a serpente *Bothrops atrox* responsável por quase 90% desses casos (dados não publicados). Estes números podem ser bem maiores devido às subnotificações, caracterizadas pela dificuldade de acesso da vítima aos locais de atendimentos e pelos sistemas de notificação deficitários.

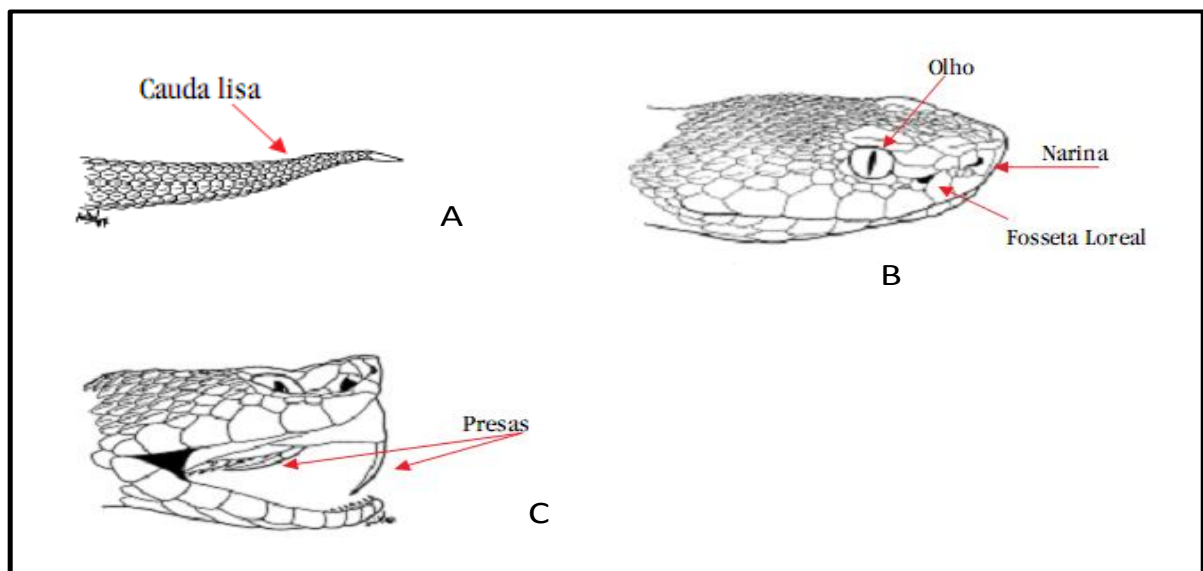
Apesar do grande número de casos, ainda são poucos os estudos científicos relacionados a acidentes ofídicos na região de Santarém, tornando importantes as pesquisas por possíveis agentes antiofídicos no que diz respeito ao conhecimento de seus efeitos farmacológicos, bem como toxicológicos.

### 1.1.2 Características das serpentes botrópicas

Como mencionamos anteriormente, as serpentes do grupo botrópico pertencem à família Viperidae e possuem algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico, pois causam a maioria dos acidentes ofídicos registrados no Brasil (SILVA *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2009). Do ponto de vista morfológico, essas serpentes são

caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, denteção do tipo solenóglifa e a presença de fosseta loreal entre o olho e a narina (Figura 2). Não possuem chocalho na cauda e as suas cores variam muito, dependendo da espécie e da região onde vivem (MELGAREJO, 2009).

Atualmente existem desse grupo 38 espécies descritas, 20 das quais ocorrem no Brasil (FRANCO, 2009). São popularmente conhecidas como jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeiro, jararaca do rabo branco, malha de sapo, patrona, surucucurana, combóia e caiçaca. Habitam zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores. Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).



**Figura 2:** Esquema das características das serpentes do grupo botrópico: A) Cauda lisa, sem maiores modificações; B) Fosseta loreal, entre olho e narina; C) Solenóglifa, dente inoculador da peçonha muito desenvolvido (Adaptado do Manual de Acidentes Ofídicos do Ministério da Saúde, 2001).

*Bothropoides jararaca* (anteriormente *Bothrops jararaca*) é a serpente peçonhenta mais comum, sendo responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Sul e Sudeste (figura 3). Possui hábito terrícola, mas também explora arbustos. Ao longo de sua distribuição apresenta variação de colorido, grande versatilidade às mudanças ambientais, sendo comum também ao longo do cinturão verde (produção de hortaliças, leguminosas, frutas ao redor das cidades) e outras áreas de ocupação humana (GOMES E PUORTO, 1993).

*Bothrops atrox* é o ofídio peçonhento mais encontrado na região Amazônica, conhecida popularmente como “jararaca-do-norte” é considerado principal causador de acidentes da Região Norte (CARDOSO *et al.*, 2009). Trata-se de uma serpente ágil e ativa,

que pode superar 1,5 m de comprimento, de colorido muito variável, que frequenta bastante as beiras de rios, córregos e igarapés (figura 4) (CARDOSO *et al.*, 2009). Em Santarém, *B. atrox* é a principal causadora dos acidentes ofídicos, de acordo informações disponíveis no Sistema de Informação Sobre Agravos Notificados – SINAN (2011).

O envenenamento por serpentes botrópicas causa inflamação (edema e eritema), equimose, bolhas e necrose (ação proteolítica) na região da picada e, sistemicamente, ativa a cascata da coagulação podendo induzir incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio (ação coagulante) e ação hemorrágica atuando no endotélio vascular na região da picada e em alguns casos à distância. Nos casos mais graves ocorrem choques e insuficiência renal podendo determinar óbito. (RIBEIRO, 1990; JORGE, 1997).



**Figura 3:** Serpente *Bothropoides jararaca* Foto: Júlio Murilo.



**Figura 4:** Serpente *Bothrops atrox* coletada na Floresta Nacional do Tapajós-FLONA/ Km 83-Santarém-PA. Foto: Helder Batista.

### 1.1.3 Peçonha botrópica

O envenenamento causado por serpentes botrópicas produz marcante dano tecidual local que incluem sintomas como dor, edema, hemorragia e necrose, e adicionalmente distúrbios sistêmicos como coagulopatias, hemorragia sistêmica e falência renal. A necrose muscular é uma séria consequência dos acidentes botrópicos que pode levar a uma perda permanente do tecido e da funcionalidade, requerendo, muitas vezes, a amputação do membro atingido (GUTIÉRREZ E LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ E RUCAVO, 2000).



Suas peçonhas compreendem misturas complexas de enzimas tóxicas e proteínas, como fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), metaloproteinases (SVMP), serinoproteases, entre outras (GUTIÉRREZ, 2002; SOARES *et al.*, 2004).

As PLA<sub>2</sub>s constituem a maioria dos componentes tóxicos da peçonha botrópica e exibem uma variedade de efeitos farmacológicos através de mecanismos que podem ser dependentes e/ou independentes de sua atividade enzimática, como neurotoxicidade, miotoxicidade, hemólise, anticoagulação, efeitos sobre plaquetas, indução de edemas e danos em tecidos (SOARES; GIGLIO, 2003; KINI, 2005).

As SVMP são toxinas hemorrágicas presentes nas peçonhas botrópicas e compartilham um domínio proteásico (metaloproteásico) que contém um átomo de zinco no seu sítio ativo. Estas enzimas, por induzirem hemorragia, são frequentemente chamadas de fatores hemorrágicos ou hemorraginas. As SVMP agem lesando a parede vascular e produzindo hemorragia por dois mecanismos distintos: diretamente sobre proteínas (laminina, fibronectina e colágeno tipo IV) da parede vascular (RUOSLAHTI E PIERSCHBACHER, 1987) e indiretamente, por ação de metaloproteases endógenas, cujos zimogênios seriam ativados pelas SVMP presentes nas peçonhas de serpentes (BJARNASON E FOX, 1995).

As serinoproteases são importantes para a ação da peçonha e algumas são denominadas “trombina-like”, pois atuam catalisando a conversão direta do fibrinogênio plasmático em fibrina, sem a necessidade da participação da trombina endógena. Estas enzimas em função da atividade catalítica, agem no sistema de coagulação sanguínea promovendo alterações na hemostasia, o que pode contribuir para uma hemorragia local e sistêmica. Elas participam da ativação do fator V da cascata de coagulação, na fibrinogenólise, na ativação de plasminogênio e indução de agregação plaquetária (SERRANO E MAROUN, 2005). Além disso, algumas dessas enzimas têm sido utilizadas como agentes anticoagulantes na área médica clínica e cirúrgica e também como reagentes em testes de coagulação (MARSH E WILLIANS, 2005).

Assim, a fisiopatologia do envenenamento por serpentes botrópicas envolve uma complexa série de eventos que vai depender da ação de uma dessas toxinas ou da combinação desses componentes da peçonha (GUTIÉRREZ, 2002).

#### **1.1.4 Soroterapia**

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para os acidentes ofídicos é a administração endovenosa de soro antiofídico de acordo com a gravidade do envenenamento.

No Brasil há três grandes centros produtores do soro antiofídico, que são: Instituto Vital Brazil (IVB, Niterói, RJ), Instituto Butantan (IBU, São Paulo, SP) e Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG). Contudo estudos demonstram que existem diferenças na capacidade neutralizante dos soros produzidos por estes centros (DA SILVA *et al.*, 2007).

A produção de soro antitoxinas animais ainda é baseada nos métodos originalmente descritos. Animais de grande porte são imunizados com peçonhas de uma ou mais espécies de serpentes de importância médica. O soro desses animais contém os anticorpos com capacidade de neutralizar as toxinas da peçonha, sendo classificados como monovalente ou polivalente, segundo o número de peçonhas empregadas na imunização (CARDOSO *et al.*, 2009).

Segundo Vilar e colaboradores (2005), no Brasil são produzidos soros antiofídicos para neutralizar as peçonhas dos principais gêneros de serpentes causadoras de acidentes.

- **Antielapídico:** soro capaz de neutralizar as peçonhas de serpentes do gênero *Micrurus* (corais). Os antígenos utilizados na imunização são as peçonhas de *M. corallinus* e *M. frontalis*, em iguais quantidades.

- **Antilaquético:** soro capaz de neutralizar a peçonha de serpentes *Lachesis* (surucucu). O antígeno é a peçonha de *L. muta*.

- **Anticrotálico:** soro capaz de neutralizar as peçonhas de serpentes do gênero *Crotalus* (cascavéis). Os antígenos utilizados na imunização são as peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* e *C.d. collilineatus*, em iguais quantidades.

- **Antibotrópico:** soro que neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. O antígeno é composto por uma mistura de peçonhas de *B. jararaca* (50%), *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. alternatus* e *B. jararacussu* em iguais proporções.

- **Antibotrópico-láquetico:** soro capaz de neutralizar as peçonhas de serpentes do gênero *Laquesis* e grupo botrópico. O antígeno é composto por mistura de peçonhas de *Laquesis muta muta* (60%) e 40% de antígeno botrópico.

- **Antibotrópico- crotálico:** soro capaz de neutralizar as peçonhas de serpentes do gênero *Crotalus* e do grupo botrópico. O antígeno é composto por mistura de peçonhas do gênero *Crotalus* e do grupo botrópico.

Apesar de a soroterapia reverter com bastante eficácia os efeitos sistêmicos da peçonha no organismo da vítima, conseguindo evitar por muitas vezes o óbito, ela apresenta algumas desvantagens como uma série de efeitos colaterais na vítima (reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro), ineficiência no combate dos efeitos

locais da peçonha (aumentando as chances de deixar sequelas no membro atingido) e a necessidade de cuidados com a estocagem do soro e com o prazo de validade (CARDOSO *et al.*, 2003).

Além disso, existem inconvenientes para essa terapia como a indisponibilidade do soro para algumas regiões do país, fazendo com que os moradores dessas regiões distantes busquem recursos que sirvam de alternativa ao tratamento ofídico (WEN, 2003; DA SILVA *et al.*, 2007).

### **1.1.5 Plantas medicinais antiofídicas: tratamento alternativo e complementar à soroterapia tradicional**

As plantas medicinais contêm substâncias bioativas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas. A flora brasileira é considerada uma das mais ricas fontes de material com potencial farmacológico e biotecnológico do mundo devido à diversidade de espécies e aos conhecimentos oriundos da medicina tradicional. É cada vez maior o interesse pelas plantas medicinais nativas do Brasil, especialmente pelas empresas farmacêuticas e de biotecnologia de outros países (DE FÁTIMA *et al.*, 2008).

As pesquisas com plantas medicinais envolvem várias áreas e etapas: 1) investigações da medicina popular e tradicional (etnobotânica); 2) isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); 3) investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); 4) transformações químicas dos princípios ativos (química orgânica sintética); 5) estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e 6) elaboração de formulações para produção de fitoterápicos. A integração dessas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho propício e dinâmico para descobertas de novos medicamentos (MACIEL *et al.*, 2002; FERNANDES, 2010).

O uso de extratos de plantas em acidentes ofídicos é comum em regiões onde o acesso à soroterapia é restrito ou nulo. Do conhecimento tradicional surgiram evidências científicas sobre as propriedades antiofídicas destes extratos. Porém, apenas nos últimos vinte anos o tema tem merecido atenção nos meios científicos (MARTZ, 1992; MORS, *et al.*, 1991). Neste sentido, várias espécies de plantas antiofídicas têm sido estudadas com intuito de caracterizar

substâncias biologicamente ativas capazes de neutralizar diversos efeitos locais e sistêmicos provocados pelas peçonhas de serpentes (MORS *et al.*, 2000).

Os extratos vegetais podem conter diversos componentes químicos tais como, alcalóides, taninos, flavonóides, triterpenos, ligninas, que têm capacidade de inibir a peçonha, atuando diretamente como inibidores enzimáticos, inativadores químicos, ou imunomoduladores, os quais interagem diretamente com macromoléculas alvo (MORS *et al.*, 2000).

Dessa forma, extratos vegetais surgem como uma alternativa no tratamento ofídico, por conter uma gama de componentes químicos com diversas propriedades farmacológicas de interesse medicinal (MARIANO *et al.*, 2005). Um grande número de extratos tem sido testado, demonstrando excelente atividade antiofídica (MELO *et al.*, 1994; SOARES *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005). O extrato aquoso e frações de *Serjania erecta* foram capazes de neutralizar as atividades da peçonha e miotoxinas isoladas de *Bothrops jararacussu* (FERNANDES *et al.*, 2011). O extrato da entrecasca de *Anacardium humile* e seu composto isolado, ácido gálico, também neutralizaram a atividade miotóxica da peçonha desta espécie, sendo a inibição atribuída ao ácido gálico que, assim como outros taninos, tem se revelado um bom inibidor das ações tóxicas de peçonhas de serpentes (COSTA, 2010). Os constituintes isolados de *Peltodon radicans* inibiram atividade edematogênica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox* (ALCÂNTARA, 2008).

Na medicina popular de Santarém, muitas plantas são recomendadas como antiofídicas porém, não existe qualquer estudo científico para investigar a eficácia dessas plantas. Há muitas histórias e poucos são os embasamentos científicos a respeito das prováveis características apresentadas pelos extratos. Em destaque as cinco espécies vegetais utilizadas como antiofídicas, cuja suas propriedades foram avaliadas neste estudo.

#### **1.1.6 *Plathymenia reticulata* Benth**

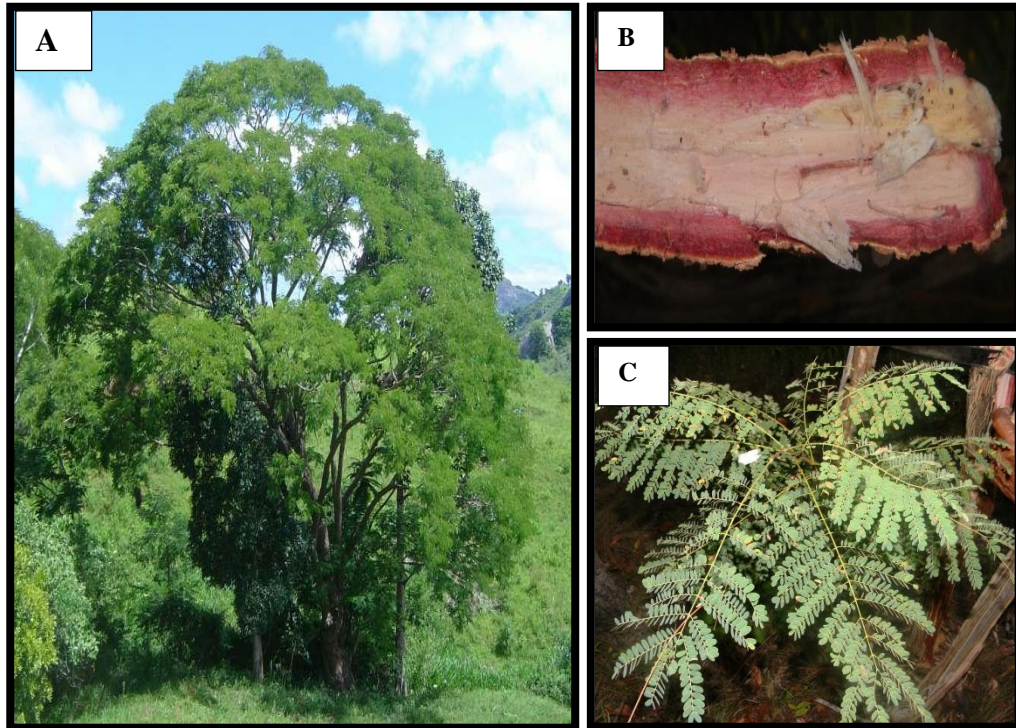
*Plathymenia* foi primeiramente descrita por Bentham (1842) que reconheceu duas espécies: *Plathymenia reticulata* Benth e *Plathymenia foliosa* Benth. A *P. reticulata*, conhecida popularmente por “vinhático”, pertence à família Leguminosae (Fabaceae) (FERNANDES, 2002), é uma árvore com aproximadamente 15 metros de altura (figura 5). Sua distribuição ocorre principalmente no Brasil, em pelo menos 15 estados (LORENZI,

2002), mas também em outros países, como Bolívia, Suriname e Paraguai (WARWICK; LEWIS, 2003).

Em 1994 o Instituto Brasileiro de Pesquisas Agropecuárias - EMBRAPA, classificou *P. reticulata*, como sendo uma das espécies vegetais mais importantes do Cerrado (ALMEIDA; SANO *et al.*, 1998) devido sua madeira de alta qualidade e potencial de utilização para recuperação de áreas degradadas (LORENZI *et al.*, 1992).

Além da importância econômica atribuída a espécie, estudos recentes tem demonstrado cada vez mais o seu valor medicinal (SILVA JÚNIOR, 2005). A espécie é utilizada na medicina popular para tratamentos de algumas doenças inflamatórias e infecciosas, para hemorragias, mordidas de insetos e carrapatos (POTT, 1994). Alguns extratos de *P. reticulata* também mostraram, *in vitro*, atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus* sp (FERNANDES *et al.*, 2005), além de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, e poliovírus (TOLEDO *et al.*, 2011).

Propriedades antiofídicas dos extratos de *P. Reticulata*, foram sugeridas nos estudos de Melo e colaboradores (2009), onde verificaram os efeitos dos taninos isolados da planta contra a peçonha de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*, e Farrapo e colaboradores (2011), demonstrando que o extrato de diclorometano das cascas *P. reticulata*, que continha alto conteúdo de polifenóis, foi capaz de reverter o bloqueio neuromuscular e efeitos miotóxicos de *B. Jararacussu*, provavelmente por precipitação de proteínas induzidas por taninos.



**Figura 5:** Aspectos gerais de *Plathymania reticulata* Benth. A) Árvore; B) Casca; C) Folhas; Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/new/vinhatico/index.htm>. Foto: Valéria Mourão

### 1.1.7 *Connarus favosus* Planch

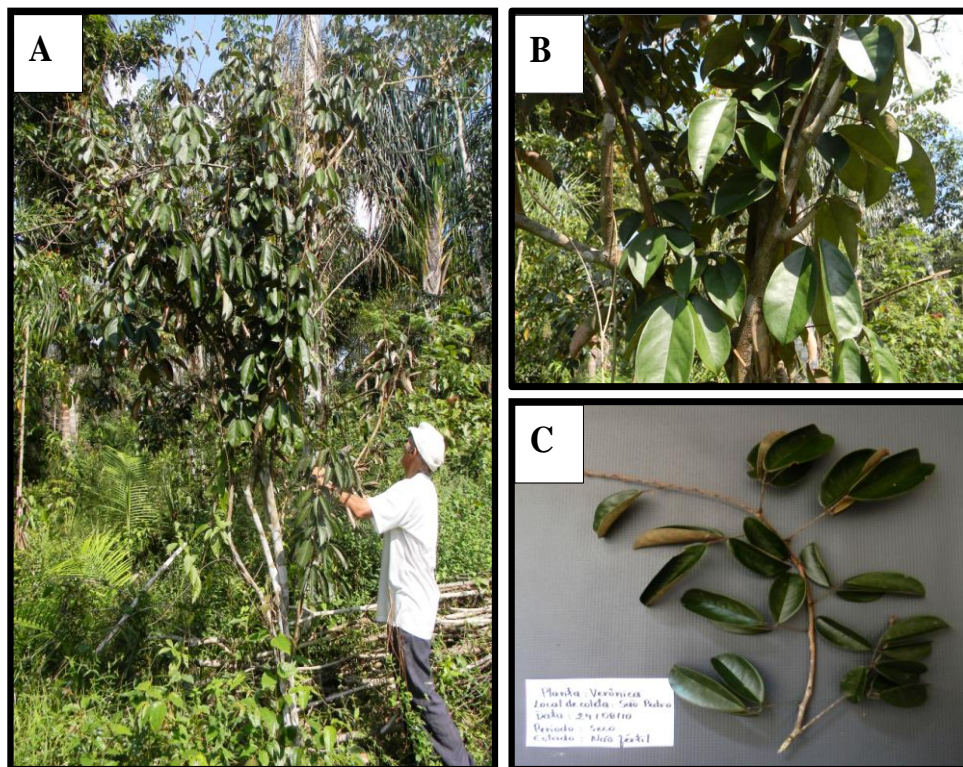
*Connarus favosus* conhecida popularmente por “verônica”, pertence a família Connaraceae (figura 6). Até o presente momento, não foi encontrado nada na literatura científica referente a atividade farmacológica desta espécie.

A família Connaraceae compreende cerca de 24 gêneros de distribuição Pantropical, com maior concentração no velho mundo. Na região neotropical, esta família está representada por cinco gêneros incluindo o gênero *Connarus*. As Connaraceae nativas estão amplamente distribuídas nos diversos ecossistemas, mas principalmente na região amazônica. As plantas pertencentes ao gênero *Connarus* caracterizam-se por serem plantas lenhosas e cujo hábito pode variar desde arbustos, arbustos escandentes, trepadeiras e lianas; possuem folhas alternas, compostas e imparipenadas (RIBEIRO 1999; SOUZA 2008).

Quanto à composição química da família os alcalóides são ausentes, possuem protoantocianidinas (cianidina e delfinidina), flavonóis, canferol, quercetina e miricetina. Não possuem saponinas ou sapogeninas (WATSON E DALLWITZ, 2007). Vários estudos estão sendo realizados com espécies da família Connaraceae, dentre elas *Rourea minor*, a qual vem sendo utilizada na medicina chinesa para o tratamento de abrasões e lesões. (HE *et al.*, 2006)

Outra espécie estudada é a *Agelaea pentagyna* (Lam.) Baill, cujo extrato metanólico de folhas de *A. pentagyna*, Connaraceae, apresentou uma grande atividade anti-histamínica (KUWABARA *et al.*, 2003). A espécie *Byrsocarpus coccineus*, apresentou excelente atividade anti-inflamatória (AKINDELE E ADEYEMI, 2007).

O estudo de *C. favosus* justifica-se pelo fato de que a espécie foi muito citada na medicina tradicional de Santarém como antiofídica, porém não há estudos científicos que comprovem sua eficácia.



**Figura 6:** Aspectos de *Connarus favosus* Planch. A) Árvore; B) Folhas; C) Folhas. Foto: Valéria Mourão.

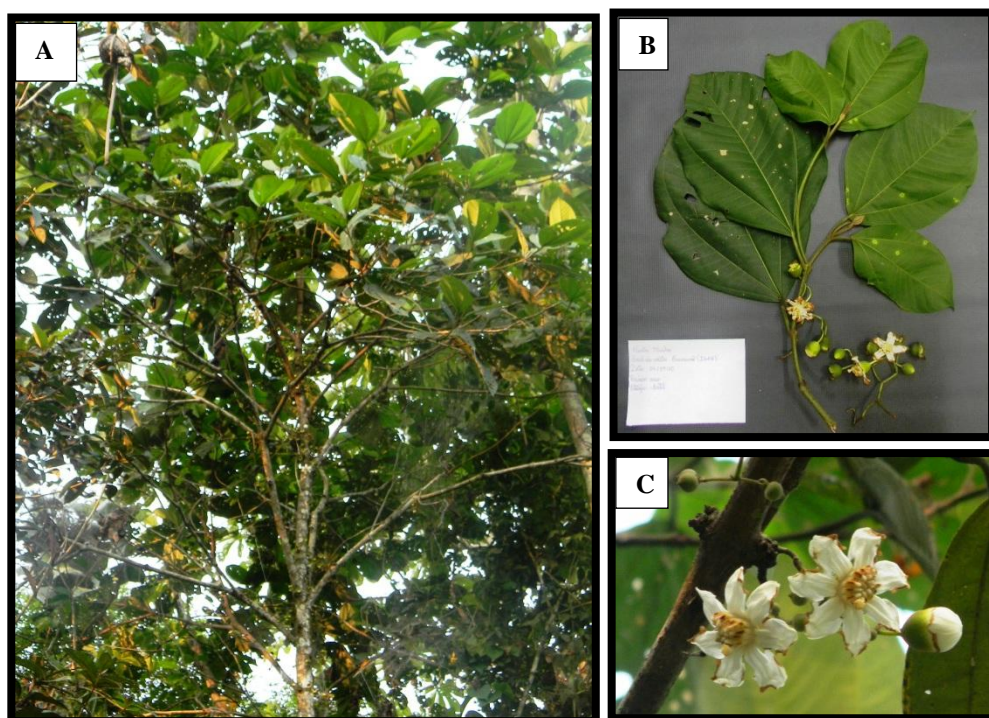
### 1.1.8 *Bellucia dichotoma* Cogn

*Bellucia dichotoma* Cogn é conhecida na medicina tradicional de Santarém como “muúba ou goiaba-de-anta”, sendo uma espécie bastante citada para tratar envenenamentos ofídicos, porém não há na literatura estudos científicos que comprovem suas propriedades farmacológicas (figura 7).

*Bellucia dichotoma* pertence a família Melastomataceae, que é constituída por aproximadamente 4.570 espécies distribuídas em 150 a 166 gêneros com distribuição pantropical com cerca de 3.000 espécies no neotrópico (CLAUSING E RENNER, 2001). No

Brasil ocorrem cerca de 68 gêneros e mais de 1.500 espécies (ROMERO E MARTINS, 2002).

Do gênero *Bellucia*, apenas as espécies *B. grossularioides* e *B. pentamera* já tiveram algum estudo fitoquímico. Isaza e colaboradores (2007) concluíram que embora *B. grossularioides* e *B. pentamera* pertençam ao mesmo gênero, elas apresentaram diferença considerável na composição química, de maneira que a espécie *B. grossularioides* é rica em compostos de média polaridade enquanto que a espécie *B. pentamera* apresentou como composto majoritário o esqualeno.



**Figura 7:** Aspecto geral de *Bellucia dichotoma* Cogn. A) Árvore; B) Folhas; C) Flores  
Foto: Valéria Mourão.

### 1.1.9 *Philodendron megalophyllum* Schott

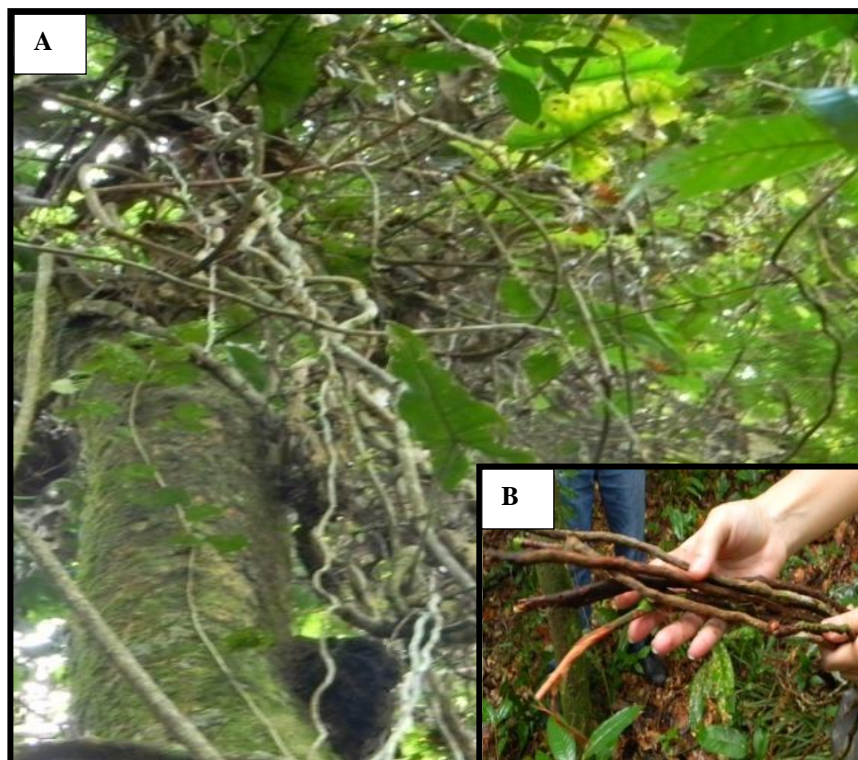
A família Araceae compreende cerca de 100 gêneros e aproximadamente 1.800 espécies. Dentre os gêneros com maior número de espécies destacam-se *Anthurium* e *Philodendron* (JOLY, 1979). O gênero *Philodendron* é o segundo maior da família Araceae. Nativas da América tropical, as mais de 700 espécies deste gênero estão espalhadas pelo mundo. Aproximadamente 160 representantes destas espécies ocorrem no Brasil (GAUTHIER *et al.*, 2008). Típico da floresta tropical, apresenta folhas grandes, vistosas e



trepadeiras (figura 8). Ocorre em vários tipos de habitats entre os quais brejos, afloramentos rochosos e até em regiões semi-áridas (GAUTHIER *et al.*, 2008).

A família Araceae tem grande importância no setor florístico e paisagístico, e está presente também no setor de alimentos. Na medicina popular são descritas diversas aplicações para o uso de algumas espécies tais como contraceptivo, no tratamento de doenças reumáticas e da pele, contra vermes intestinais, mordedura de serpentes e hemorroidas (LAINETTI *et al.*, 1999). Em sua composição química são descritas a presença de resorcinóis, esteróides, poliprenoides, estigmastenona, além de miristoleato de etila,  $\alpha$ - bisabolol, isopalmitato de etila e palmitato de etila, constituinte majoritário de *Philodendron imbe* (FEITOSA *et al.*, 2007).

Apesar de algumas espécies do gênero *Philodendron* já serem objetos de estudo de alguns pesquisadores, pouco se sabe sobre a composição química e a sua toxicidade. Na literatura são escassas as informações sobre atividades biológicas atribuídas a *P. megalophyllum* e não consta nenhum estudo que tenha verificado sua propriedade antiofídica.



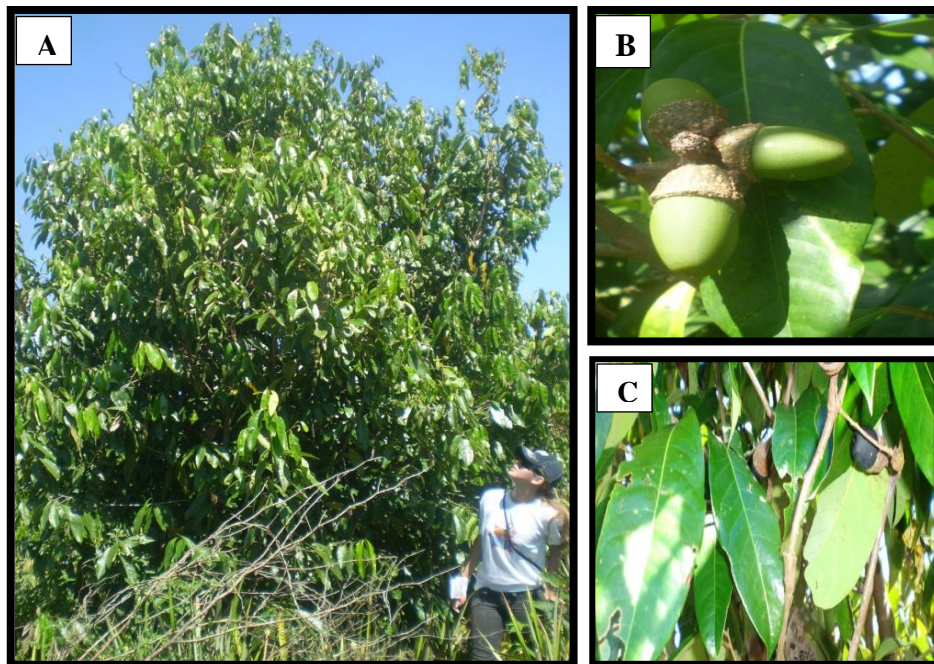
**Figura 8:** *Philodendron megalophyllum* Schott. A) Folhas; B) Cipó. Foto: Valéria Mourão

### 1.1.10 *Aniba fragrans* Ducke

*Aniba fragrans* conhecida popularmente como “macacaporanga” é produtora de óleo essencial e apresenta grande potencial para ser utilizada na indústria de perfumaria (MAIA *et al.*, 2001). Por ser uma espécie aromática têm sido bastante utilizada na preparação de “banhos de cheiro” comumente usados nas festas juninas, no estado do Pará (RODRIGUES, 1989). Em sua composição química apresenta o Linalol como componente majoritário, que é reconhecido por sua atividade anti-inflamatória (MAIA *et al.*, 2001).

*Aniba fragrans* é uma espécie nativa da região Amazônica (figura 9) pertencente a família Lauraceae, que destaca-se pela sua importância econômica, por apresentar várias espécies de valor comercial. Suas árvores chegam a atingir até 30 m de altura e todas suas partes são aromáticas. Apresentam características de floresta pluvial, solos argilosos e não inundáveis. Suas folhas são coriáceas, inflorescência lateral de até 2,5 cm de comprimento, multifloral, de flores pequenas, ferrugínea, fruto do tipo baga de aproximadamente 25 x 20 mm, e quando maduro cor vinho escuro (MATTOSO, 2005).

As informações sobre *A. fragrans* são escassas e não foi encontrado na literatura trabalhos que comprovem sua atividade biológica.



**Figura 9:** Aspecto geral de *Aniba fragrans* Ducke. A) Árvore; B) Frutos; C) Folhas. Foto Valéria Mourão.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral:**

Avaliar a eficácia de plantas indicadas como antiofídicas pelos moradores da região de Santarém-PA frente a peçonhas brutas botrópicas.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- ✓ Realizar levantamento etnobotânico em comunidades de Santarém a respeito do uso de plantas antiofídicas;
- ✓ Determinar o perfil fitoquímico dos extratos vegetais;
- ✓ Avaliar a capacidade dos extratos vegetais na neutralização da hemorragia induzida pela peçonha de *Bothropoides jararaca*;
- ✓ Avaliar a capacidade dos extratos vegetais na neutralização de peçonha de *Bothrops atrox* quanto às atividades: hemorrágica, coagulante, fosfolipásica e edematogênica.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, A. F. C.; SILVA, M. C.; FRANÇA, R.C.; PILÓ-VELOSO, D. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 744-750, 2008.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M. **Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA – CPAC**, 1998.
- AKINDELE, A. J.; ADEYEMI, O. O. Antipyretic Activity of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn (Connaraceae). **International Journal of Pharmacology**, v.3, n. 4, p. 357-361, 2007.
- ARAÚJO, F. A.; SANTALÚCIA, M. E CABRAL, R. F. **Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes** (CARDOSO, J. L. *et al.* Org.). São Paulo: Sarvier, p. 6-12, 2003.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cadastro de Saúde Pública**, v.19, p. 7-16, 2003.
- BORGES, C.C.; CAVALCANTI-NETO, A. J; BOECHAT, A. L; FRANCISCO, C. H; ARRUDA, M. R E SANTOS, M. C. Eficácia da espécie vegetal *Peltodon radicans* (Labiatae, Lameaceae) na neutralização da atividade edematogênica e ineficácia do extrato vegetal Específico Pessoa na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops atrox*. **Revista da Universidade do Amazonas**. v.1, p. 97-113, 1996.
- BRASIL. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Ministério da Saúde. **Fundação Nacional de Saúde**. Brasília, p.131, 1999.
- BRAZIL, O.V. Prefácio. **In: Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes** (CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F.H. MÁLAQUE, M. S. E HADDAD JR, V. Eds. SARVIER-FAPESP, São Paulo p. 468, 2003.
- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, S. A.; HADDAD, V. J.; **In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Ed. Sarvier. 2003.
- CARDOSO, D. F.; YAMAGUCHI, I. K.; MOURA-DA-SILVA, A. M. **Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo p. 419, 2009.
- CLAUSING, G. E RENNER, S. S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany**. v. 88, n. 3, p. 486-498, 2001.
- COSTA, T. R. **Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial**

**antimiotóxico.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão- Preto –USP, 2010.

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

DE FÁTIMA, A.; MODOLO L. V.; SANCHES, A. C.; PORTO, R. R. Wound healing agents: the role of natural and non-natural products in drug development. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 879-888, 2008.

DE OLIVEIRA, M.; CAVALCANTE, W. L. G.; ARRUDA, E. Z.; MELO, P. A.; SILVA, M. D.; GALLACCI, M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of *Bothrops* toxin-I by suramin. **Toxicon**, v. 42, p. 373-379, 2007.

FARRAPO, N. M.; SILVA, G. A. A.; COSTA, K. N.; SILVA, M. G.; COGO, J. C.; BELO, C. A. D.; SANTOS, M. G.; GROppo, F. C.; FRANCO - OSHIMA, Y. Inhibition of *Bothrops jararacussu* venom activities by *Plathymenia reticulata* Benth extracts. **Journal of Venom Research**. v. 2, p. 52-60, 2011.

FEITOSA, C. M.; BEZERRA, M. Z. B.; CITÓ, A. M. G. L.; COSTA JÚNIOR, J. S.; LOPES, J. A. D.; MIOTA NETO, J. M. Constituintes Químicos de *Philodendron imbe* Schott. **Química Nova**. v.30, p. 41-44. 2007.

FENWICK, A.M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**. v. 156, p. 617–640, 2009.

FERNANDES, A. T. **Atividade farmacológica dos extratos obtidos de *Plathymenia reticulata* Benth (leguminose).** Dissertação de Mestrado-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2002.

FERNANDES, R. S. **Avaliação da atividade antiofídica do extrato de *Serjania erecta* Radlk in natura e in vitro: Isolamento e caracterização individual de compostos Bioativos.** Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão- Preto –USP, 2010.

FERNANDES, R. S.; COSTA, T. R.; MARCUSSI, S.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; RODRIGUÉZ, GONZALÉZ II.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 17. p. 85-93. 2011.

FRANCO, L. F. Origem e diversidade das serpentes. **In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** Cardoso, J. L. C; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (ORG). Sarvier: São Paulo, p.22-41, 2009.  
FURTADO, M. F. D; COLLETO, G. M. D. D; DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade

dos venenos Animais e dos correspondentes Antivenenos. Memórias Instituto Butantan, v.53, n.2, p. 149-159, 1991.

FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. **In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes** (Org). Ed. Sarvier: São Paulo, p. 419-431, 2009.

GAUTHIER, M. P. L.; BARABE, D.; BRUNEAU, A. Molecular phylogeny of the genus *Philodendron* (Araceae): delimitation and infrageneric classification. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.156. p. 13-27, 2008.

GOMES, N. E PUORTO, G. **Atlas anatômico de *Bothropoides jararaca* Wied, (Serpentes, Viperidae)**. Wied. Mem. Inst. Butantan, v. 55, supl. 1, p. 69-100. 1824.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, p. 1405-24, 1995.

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local damage. **Biochemie**. v. 82: p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Revista de Biología Tropical**, v. 50, p. 377- 394, 2002.

HE, Z-D.; MA, C-Y. TAN, G. T.; SYDARA, K.; TAMEZ, P.; SOUTHAVONG, B.; BOUAMANIVONG, S.; SOEJARTO, D. D.; PEZZUTO, J. M; FONG, H. H. S.; ZHANG, H-J. Rourinoside and Rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. **Hytochemistry**, v.67, p.1378-1384, 2006.

ISAZA M.; OROZCO, J. H.; ZULETA, L. M.; RIVERA, D. A.; TAPIAS I. L. J.; VELOZA, L. A.; RAMÍREZ A. Perfíles cromatográficos preliminares por GC-MS de espécies de plantas melastomatáceas. **Scientia et Technica**, v.33, p.359, 2007.

JOLY, A. B.; **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**, 5ª ed., Ed. Nacional: São Paulo, 1979.

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

JORGE, M. T. E RIBEIRO, L. A. Infections in the bite site after envenoming by snakes of the *Bothrops* genus. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 3, n.2, p. 264-272, 1997.

KINI, R. M. Structure-function relationship and mechanism of anticoagulant phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45. p. 1147-61. 2005.

KUWABARA, H.; MOURI K.; OTSUKA, H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Tricin from a Malagasy Connaraceous plant with potent antihistaminic activity. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1273-1275, 2003.

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

LAINETTI, R.; VIEIRA, A. C. M.; PEREIRA, N. A. Ação edematogênica em *Philodendron corcovadense* Kunth. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.80, p. 64-65, 1999.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa. Ed. Plantarum, 1992.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa. Ed. Plantarum, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, p. 429-438, 2002.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Goeldi editoração, Belém. v. 1, p. 52, 2001.

MAIORANO, V.A.; Marcussi, S.; DAHER, M.A.F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A. ; FRANÇA, S. C. F.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal Ethnopharmacology**, v.02, p. 364–370, 2005.

MARSH, N. A.; WILLINAS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v.45, n.8, p. 339-410, 2005.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v.30, n.10, p. 1131-1142, 1992.

MATTOSO, E. **Estudo de fragrâncias amadeiradas da Amazônia**. Dissertação de Mestrado em Química orgânica, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. p. 143, 2005.

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

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

MELO, R. F.; FARRAPO, N. M.; ROCHA - JUNIOR, D. S.; SILVA, M. G.; COGO, J. C.; OSHIMA-FRANCO, Y.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GROppo, F. C. Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In: Raymond B. Keller. (Org.). **Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources**. New York: **Nova Science Publishers**, p. 249-262, 2009.

MORS, W. B. **Plants against snake-bites**. Memória Instituto Oswaldo Cruz., v.2, p.193, 1991.

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

MS (MINISTÉRIO DA SAÚDE)/FUNASA (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE) (2001). **Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília: MS/FUNASA.

NAKAGAWA, M.; NAKANISHI, k.; DARKO, L. L E VICK, J. A. Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms. **Tetrahedron Letters**, v.23, n.38, p. 3855-3858, 1982.

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

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

OLIVEIRA, M. E.; MARTINS, M. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central Amazonia, Brazil. **Herpetology Natural History**, v.8, n.2, p. 101–110, 2001.

OTERO, R., R. J.; FONNEGRA E JIMÉNEZ, S. L. **Plantas utilizadas contra mordeduras de serpientes em Antioquia y Chocó, Colombia**. Universidad de Antioquia. Medellín, p. 402, 2000.

PARDAL, P. P. O.; MONTEIRO, M. R. C. C.; ARNAUND, R. N.; LOPES, F. O. B.; ASANO, M. E. Aspectos epidemiológicos de 465 acidentes ofídicos atendidos no HUIBB - Belém - Pará no período de 1993 a 1994. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28. p. 170, 1995.

PINHO, F. M.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.47, n.1, p. 24-29. 2001.

POTT, A.; POTT, V. J. *Plathymentia reticulata*, Leguminosae)Mimosoideae. In: **Brazilian Agricultural Research Corporation Plants of Pantanal**. EMBRAPA-CPAP-SPI, Brasília, DF, Brazil, 1994.

RIBEIRO J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L; PEREIRA, E. C.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação de plantas vasculares em uma floresta de terra firme da Amazônia Central**. Manaus, INPA, 1999.

RODRIGUES, R. M. **A Flora da Amazônia. Cultural**. CEJUP, Belém. v. 2, p. 462. 1989.



ROMERO, R.; MARTINS, A. B. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.1, p. 19-24, 2002.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrines. **Science**, v.238 n. 4826, p. 491-497, 1987.

SANO-MARTINS, I. C.; SANTORO, M. L.; **Distúrbios hemostáticos em envenenamento por animais peçonhentos do Brasil**. In: CARDOSO, J. L. C. *et al.* Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica do Acidentes. São Paulo, Sarvier, p. 289-309. 2003.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v.45, n.8, p. 1115-1132, 2005.

SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**. v. 41, p. 251-255, 2003.

SILVA JÚNIOR, M. C. **Cem árvores do Cerrado: guia de campo**. Rede de sementes do Cerrado. Brasília, 2005.

SOARES, A. M.; JANUARIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S. Neutralizing effects off Brazilian plants against snake venoms. **Drugs future**, Barcelona, v.29, n.11, p. 1105-1117, 2004.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; Chemical modifications of phospholipases A<sub>2</sub> from snakes venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**. v. 42. p. 255-68, 2003.

SOUZA, V.C. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado no APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2008.

TOLEDO, C. E.; BRITTA, E. A.; CEOLE, L. F. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **J Ethnopharmacol**. v. 133. p. 420- 425, 2001

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval**. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>>. Acesso em: 01 jun 2007.

WARWICK, M. C.; LEWIS, G. P. Revision of *Plathymentia* (Leguminosae-Mimosoideae). **Edinburgh Journal of Botany**. v. 60, p. 111-119, 2003.

WEN, F. H. **Soroterapia**. In **animais peçonhentos do Brasil: Biologia, clinica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier: p. 380-393, 2003.

## CAPÍTULO I

### **ESTUDO ETNOBOTÂNICO, QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIHEMORRÁGICA DE EXTRATOS VEGETAIS FRENTE À PEÇONHA DE *Bothropoides jararaca*\***

---

\* Capítulo escrito de acordo com as normas da revista The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (<http://www.scielo.br/revistas/jvatitd/iinstruc.htm>) o qual deverá ser submetido após a tradução para língua inglesa.

**Estudo etnobotânico, químico e atividade antihemorrágica de extratos vegetais frente à peçonha de *Bothropoides jararaca***

**Moura VM (1,2), Sousa LAF (2), Lima AE (2), Castro KCF (3), Silva MN (3), Arruda AC (3), Silva AMM (4), Mourão RHV (1,2)**

(1) Programa de Pós - Graduação em Recursos Naturais da Amazônia - PGRNA, Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Santarém, Pará, Brasil. (2) Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental-LabBBE- UFOPA, Santarém, Pará, Brasil (3) Laboratório de Cromatografia Líquida-LABCROL e Central de Extração, Universidade Federal do Pará-UFPA, Belém, Pará, Brasil (4) Instituto Butantan- IBU, São Paulo-SP, Brasil.

**RESUMO:** Para complementar a soroterapia em acidentes ofídicos, muitas plantas da medicina popular estão sendo estudadas por sua grande quantidade de compostos químicos e atividades farmacológicas. O objetivo do trabalho foi verificar o uso de plantas em acidentes ofídicos pelos moradores de Santarém-PA, Brasil, traçando o perfil fitoquímico e avaliando ação dos extratos na neutralização da hemorragia induzida pela peçonha bruta de *Bothropoides jararaca*. Foram citadas 24 plantas usadas em envenenamentos distribuídas em 22 famílias. *Bellucia dichotoma*, *Aniba fragrans*, *Annona montana*, *Conarus favosus*, *Justicia* sp., *Plathymenia reticulata*, *Philodendron megalophyllum*, *Cassia fístula*, *Libidibea ferrea*, *Crateva benthami*, *Kalanchoe brasiliensis* e *Dipterix odorata* foram as espécies mais citadas. O perfil cromatográfico dos extratos aquosos (EAs) destas espécies foi determinado por Cromatografia em Camada Delgada. Para os ensaios de inibição da hemorragia causada pela peçonha foram utilizadas soluções contendo a peçonha misturada com EAs em duas proporções 1:12 e 1:48 (m:m). Os EAs de *B. dichotoma*, *C. favosus*, *P. reticulata* e *P. megalophyllum* inibiram 100% a hemorragia e ocorreu com percentuais diferentes para os extratos *A. fragrans* e *k. brasiliensis*. Contudo, os EAs de *C. fistulosa*, *C. benthami*, *D. odorata*, *A. montana*, *L. ferrea* e *Justicia* sp não neutralizaram a hemorragia nas mesmas condições experimentais. Os EAs apresentaram várias classes de compostos entre elas: cumarinas, flavonoides, ácidos graxos, antraquinonas e terpenos. Os resultados mostram que os EAs apresentam propriedade neutralizante frente à ação da peçonha de *B. jararaca*, porém ainda não é possível inferir qual ou quais dos constituintes presentes nestes extratos são responsáveis pela inibição observada.

**Palavras- chave:** Extratos vegetais, ofidismo, *Bothropoides jararaca*, hemorragia.

**ABSTRACT:** To complement the antivenom in snakebites, many plants of folk medicine are being investigated for its large number of chemical compounds and pharmacological activities. The objective of this study was to investigate the use of plants for snakebites by the residents of Santarém-PA, Brazil, tracing the phytochemical profile and evaluating the action of the extracts in the neutralization of hemorrhage induced by crude venom of *Bothropoides jararaca*. Were cited 24 plants used in poisonings distributed among 22 families. *Bellucia dichotoma*, *Aniba fragrans*, *Annona montana*, *Conarus favosus*, *Justicia* sp. *Plathymenia reticulata*, *Philodendron megalophyllum*, *Cassia fistula*, *Libidibea ferrea*, *Crateva benthami*, *Kalanchoe brasiliensis* and *Dipterix odorata* were the most cited. The chromatographic profile of the aqueous extracts (AEs) of these species was determined by Thin Layer Chromatography. For the tests of inhibition of bleeding caused by venom, solutions were used containing the poison mixed with AEs in two proportions 1:12, 1:48 (w: w). The AEs *B. dichotoma*, *C. favosus*, *P. reticulata* and *P. megalophyllum* inhibited 100% bleeding and occurred with different percentage for the extracts *A. fragrans* and *K. brasiliensis*. However, AEs *C. fistulosa*, *C. benthami*, *D. odorata*, *A. montana*, *L. ferrea* and *Justicia* sp do not neutralized the hemorrhage in the same experimental conditions. AEs were several classes of compounds including: coumarins, flavonoids, fatty acids, anthraquinones and terpenes. The results show that AEs have neutralizing property to the action of the venom of *B. jararaca*, but is not yet possible to infer which one or ones of the constituents present in these extracts are responsible for the inhibition observed.

**Keywords:** Plant extracts, snakebites, *Bothropoides jararaca*, hemorrhage.

**CONFLITOS DE INTERESSE:** Não há conflito

**ORGÃO FINANCIADOR:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior- CAPES.

**ENDEREÇO DE CORRESPONDÊNCIA:**

VALÉRIA MOURÃO DE MOURA, Programa de Pós – Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA, Brasil. Fone: +55 93 21014943. Email: mouraovm@yahoo.com.br ou mouraorhv@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

*Bothropoides jararaca* é a serpente peçonhenta mais comum, sendo responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Sul e Sudeste aproximadamente 90% dos casos. O envenenamento por estas serpentes induzem reações locais imediatas como dor, edema, hemorragia, mionecrose e reações sistêmicas, onde se destacam as atividades coagulantes e hemorrágicas (1). Os antivenenos comercializados atualmente neutralizam principalmente os efeitos sistêmicos, sendo pouco eficazes para os efeitos locais, dificultando o tratamento dos acidentados podendo resultar em sequelas permanentes ou perda do membro afetado (2).

O uso de plantas no combate aos efeitos de acidentes ofídicos tem sido utilizado como uma prática medicinal comum em todo o mundo, principalmente em regiões onde o acesso a soroterapia é restrito ou nulo (3). Na região amazônica, por exemplo, a utilização de preparados oriundos de plantas em acidentes ofídicos ainda é bastante comum, muitas vezes a única alternativa para muitas comunidades.

As plantas medicinais apresentam uma importante fonte de produtos bioativos com potencial de auxiliar diretamente no tratamento do envenenamento ofídico, ou indiretamente na suplementação da soroterapia convencional. Muitas espécies de plantas antiofídicas têm sido estudadas com o intuito de validar o uso popular ou caracterizar substâncias biologicamente ativas capazes de neutralizar diversos efeitos locais e sistêmicos provocados pelas peçonhas de animais (4).

Estudos têm demonstrado que extratos vegetais têm ação antiofídica, muitos deles com a capacidade de neutralizar, ao menos *in vitro*, as ações das metaloproteinases presentes na peçonha bruta de *Bothropoides*, responsável por quadros hemorrágicos em suas vítimas, quando envolvidos em acidentes ofídicos (5, 6, 7). Os extratos aquosos de *Apodanthera villosa*, *Arthrocerus glaziovii*, *Jatropha mollissima*, *Jatropha elliptica* apresentaram efeito antihemorrágico contra a peçonha de *Bothropoides jararaca* (8). Silva e colaboradores (9) demonstraram que o extrato aquoso da espécie *Pentaclethra macroloba* inibe principalmente a atividade hemorrágica das peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* sp e *Lachesis muta*. Outros trabalhos foram desenvolvidos demonstrando os efeitos inibitórios de uma série de extratos brutos e com diversos componentes semi puros e puros sobre as atividades miotóxica, neurotóxica hemorrágicas e fosfolipásicas (5, 10, 11, 12, 13).

Embora existam estudos relacionados aos efeitos de plantas antiofídicas, ainda são poucos os conhecimentos científicos a respeito das prováveis características antiofídicas apresentadas por extratos vegetais e/ou compostos isolados. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo realizar um levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como antiofídicas pela população de Santarém-PA, bem como avaliar o possível efeito neutralizador dos extratos obtidos das plantas mais citadas frente a peçonha bruta de *Bothropoides jararaca*, traçando o perfil fitoquímico dos mesmos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Levantamento etnobotânico, coleta e identificação do material vegetal**

Foi realizado um levantamento etnobotânico sobre uso de plantas medicinais antiofídicas, nas comunidades de São Pedro, Cucurunã, Alter do Chão e no mercado central de Santarém - PA, Brasil, as quais apresentam alto índice de acidentes ofídicos. O levantamento foi feito através de entrevistas diretas aplicando perguntas por meio de um formulário o qual continha questões abertas semi estruturadas sendo utilizadas para este trabalho as questões que envolviam uso de plantas antiofídicas (anexo). Os dados foram coletados de março a maio de 2010 com termo de consentimento livre e esclarecido por todos os participantes, garantindo o anonimato e o direito de não participar em qualquer momento da pesquisa. As plantas mais citadas foram coletadas para confecção de exsiccatas, preparo de extratos, estudo fitoquímico e atividade anti-hemorrágica frente a peçonha bruta de *Bothropoides jararaca*. As espécies foram identificadas pela botânica Dra. Regina Célia Viana Martins da Silva e exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário Embrapa Amazônia Oriental/Belém sob os códigos (IAN): 185215 (*Plathymania reticulata*), 185216 (*Conarus favosus*), 184899 (*Philodendron megalophyllum*), 184897 (*Aniba fragrans*), 185213 (*Bellucia dichotoma*), 184694 (*Dipteryx odorata*), 185214 (*Annona montana*), 185211 (*Libidibia ferrea*), 184526 (*Justicia* sp.), 184691 (*Cassia fistula*), 184695 (*Kalanchoe brasiliensis*) e 184823 (*Crateva benthami*). Os pontos de coleta foram marcados através de um Sistema Global de Medição de Posição (GPS - GARMIN Map 60csx), apresentando as seguintes coordenadas: Comunidade de São Pedro (Brasil, 02°32'08,9" S e 54°54'23,9" W) , Cucurunã (Brasil, 02°27'21.0" S e 54°47'45,7" W) e Fazenda

Experimental Curauá (02°33'99.3" S e 54°36'61,2" W). As espécies foram listadas pelo nome popular seguido do nome científico, família botânica, informações da parte da planta utilizada e formas de usos.

### **Preparo dos extratos vegetais**

Os extratos aquosos (EAs) foram preparados a partir da parte da planta a qual foi indicada na pesquisa inicial como sendo usada pela população. As plantas após limpeza e seleção foram secas em estufa com ventilação de ar forçada a 40 °C (Licit LC–E80), sendo posteriormente pulverizado com auxílio de moinho de facas. Os pós obtidos foram submetidos a extração com água destilada na proporção de 1:5 (p:v) sob agitação constante de 1.250 rpm á temperatura de 70°C ± 5° por 2 horas, em seguida foram filtrados, liofilizados e codificados como BD (*Bellucia dichotoma*), AF (*Aniba fragrans*), AM (*Annona montana*), CF1 (*Connarus favosus*), J1 (*Justicia* sp.), PR (*Plathymenia reticulata*), PM (*Philodendron megalophyllum*), CF2 (*Cassia fistula*) LF (*Libidibea ferrea*), CB (*Crateva benthami*), KB (*Kalanchoe brasiliensis*), DO (*Dipterix odorata*). O rendimento de cada extrato foi calculado com base na biomassa seca.

### **Perfis cromatográficos dos extratos vegetais**

Os perfis cromatográficos dos extratos foram obtidos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para realização das análises, foram utilizados três módulos do sistema HPTLC sendo um aplicador automático modelo ATS4, um fotodocumentador modelo TLC Visualizer e uma cuba bipartida 20x10 cm, tendo como software de registro WinCats 1.4.4, todos da marca Camag, Muttenz, Suíça. Para o preparo das soluções, foram pesados 10 mg dos extratos de cada planta selecionada e adicionados 5 mL de metanol. As soluções foram submetidas a banho ultrassônico por 1 minuto em ultrassom modelo 251 da marca Branson®, obtendo-se 12 amostras com concentração de 2000 µg/mL. Alíquotas de 1,5 mL de cada solução foram transferidas para vials para posterior análise. Para confirmar a possível presença de cumarinas, flavonóides e terpenóides nos 12 extratos, foram empregadas soluções padrões de esculina, rutina e timol todos da Sigma-Aldrich com 98% de pureza e concentração de 1000 µg/mL cada. Volumes de 10 µL foram aplicados em cada inóculo totalizando 15 inóculos por cromatoplaça, tendo como

fase estacionária placas TLC sílica gel F<sub>254</sub> de 20x10 cm com suporte de alumínio da marca M&N e como fase móvel 4 sistemas de eluição distintos, com variação na concentração dos solventes em ordem de polaridade crescente que foram: sistema apolar, composto por hexano:acetato de etila:ácido fórmico nas proporções 42,5:7,5:2,5 (v/v); sistema polar ácido, composto por acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água nas proporções 25:2,75:2,75:6,75 (v/v); sistema polar básico, composto por acetato de etila:isopropanol:dietilamina nas proporções 9:7:4 (v/v) e sistema de média polaridade, composto por hexano:acetato de etila:ácido fórmico nas proporções 5:5:1 (v/v). Após eluição, as cromatoplaças foram fotodocumentadas no comprimento de onda 366 nm e em seguida derivatizadas com reagentes específicos para cada tipo de sistema visando evidenciar as principais classes de substâncias químicas presentes nos extratos: vanilina sulfúrica ácida (VAS) para a detecção de terpenóides (coloração amarelo-marrom) e ácidos graxos (coloração azul); NP-PEG (difenilboriloxietilamina/ polietilenoglicol) para detecção de cumarinas (coloração azul-verde) e flavonóides (coloração amarelo-laranja) sob luz UV 366 nm; hidróxido de potássio (KOH) para detecção de antraquinonas (coloração vermelho-amarelo) e cumarinas (azul-verde) sob luz UV 366 nm. Os aspectos considerados foram cor e altura antes e após exame com luz UV e mudanças de coloração com o uso de reveladores.

### **Animais e peçonha**

A peçonha bruta de *Bothropoides jararaca* liofilizada foi cedida pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Doze grupos de quatro camundongos *Swiss* de ambos os sexos (34-41 g), foram obtidos do biotério da Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará. Os animais foram mantidos em condições padrões (temperatura 22 ± 1 °C, ciclo de 12 h claro/12 h escuro) e acondicionados em gaiolas padrões, com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes da Lei Federal 11.794 e com aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Estadual do Pará (UEPA) com o número de protocolo 43/11 (anexo).



### **Inibição da peçonha**

A peçonha bruta de *B. jararaca* foi dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%) 1mg/mL e a concentração de proteína determinada pelo método de Bradford (1976). Para os experimentos de inibições, soluções contendo uma quantidade fixa de proteína de peçonha foram misturadas com diferentes quantidades dos extratos vegetais em diferentes proporções de peçonha:inibidor (m:m). Todas as misturas foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos, mantendo os seguintes grupos: peçonha bruta + salina (controle positivo), peçonha bruta + extrato vegetal (teste) e extrato vegetal + salina (controle negativo).

### **Atividade hemorrágica**

A hemorragia causada pela peçonha de *B. jararaca* foi determinada de acordo com o método descrito por Kondo e colaboradores (14) com modificações, que consiste na menor quantidade de peçonha que produz um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro (DMH). Foram injetados intradermicamente no dorso de camundongos *Swiss* (n = 4; pesando de 34 a 41 g) 50 µL das amostras contendo 10 µg (2DMH) da peçonha diluída em NaCl 0,9%, pré-incubada com os extratos vegetais em duas proporções 1:12 e/ou 1:48 (m:m). Uma hora após a injeção, os animais foram sacrificados, o tecido dorsal foi removido e digitalizado e o halo hemorrágico determinado de acordo com a metodologia abaixo.

### **Determinação do diâmetro médio da lesão hemorrágica**

A medida do halo hemorrágico foi realizada através do processamento da imagem do tecido, utilizando-se ferramentas da morfologia matemática (15). A imagem foi digitalizada (Scanner HP Deskjet F4280) e salva no formato RGB, com a sua resolução e as dimensões do pixel conhecidas. Um Script Matlab (16) sendo posteriormente processado de forma a ler a imagem e separar as componentes RGB. Cada componente sofreu um ajuste de contrastes e filtragens, de forma a destacar o objeto alvo (halo hemorrágico) em relação ao fundo (tecido e lâmina). A componente que melhor destaca o objeto em relação ao fundo foi escolhida para ser processada. A seguir um operador de Limiarização (17) foi aplicado sobre a componente escolhido de forma a localizar e isolar os pixels que caracterizam o halo hemorrágico, tendo como resultado uma imagem binária com o objeto isolado. Para

eliminar pequenas partículas dispersas e corrigir a forma do objeto destacado, um operador de abertura foi aplicado sobre a imagem binária. Finalmente, o operador de gradiente morfológico é aplicado à imagem binária tratada, de forma a destacar o contorno do objeto. O contorno é colocado sobre a imagem original (RGB) de forma a destacar o halo. Já a área e o diâmetro maior são obtidos do objeto, na imagem binária, através de contagem de pixels e do cálculo de distâncias (18), sendo que a área do halo hemorrágico obtida é expressa em mm<sup>2</sup>.

### **Análise estatística**

Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão (DP), obtidos com o número de animais indicados. A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste *t-Student*, sendo o valor de  $p < 0,05$  considerado significativo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Levantamento etnobotânico**

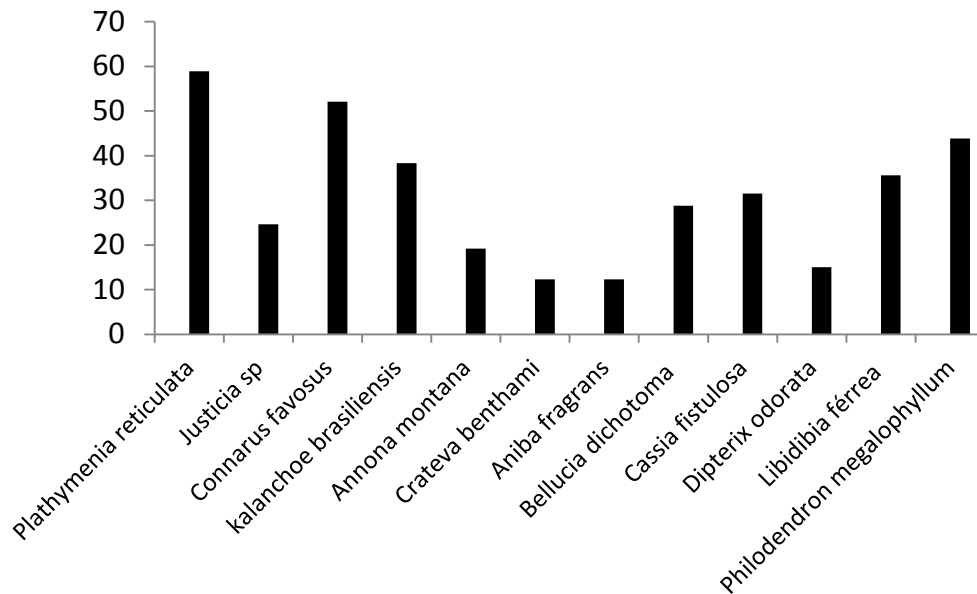
O levantamento etnobotânico nas comunidades de São Pedro, Cucurunã, Alter do Chão e no mercado central de Santarém revelou que do total de 83 entrevistados, 84,4% mostraram conhecer a frequência de acidentes ofídicos em sua comunidade e 48% afirmaram já ter feito uso ou conhecer alguém que tenha utilizado extratos vegetais para envenenamentos ofídicos. As representações populares, com seus métodos alternativos para tratar os diversos males entre eles envenenamentos por animais peçonhentos ainda são bastantes fortes mesmo para aqueles que têm acesso a soroterapia.

Foram citadas 24 plantas de uso antiofídico distribuídas em 22 diferentes famílias (tabela 01 e figura 01). As 12 plantas mais citadas estão apresentadas na figura 02.

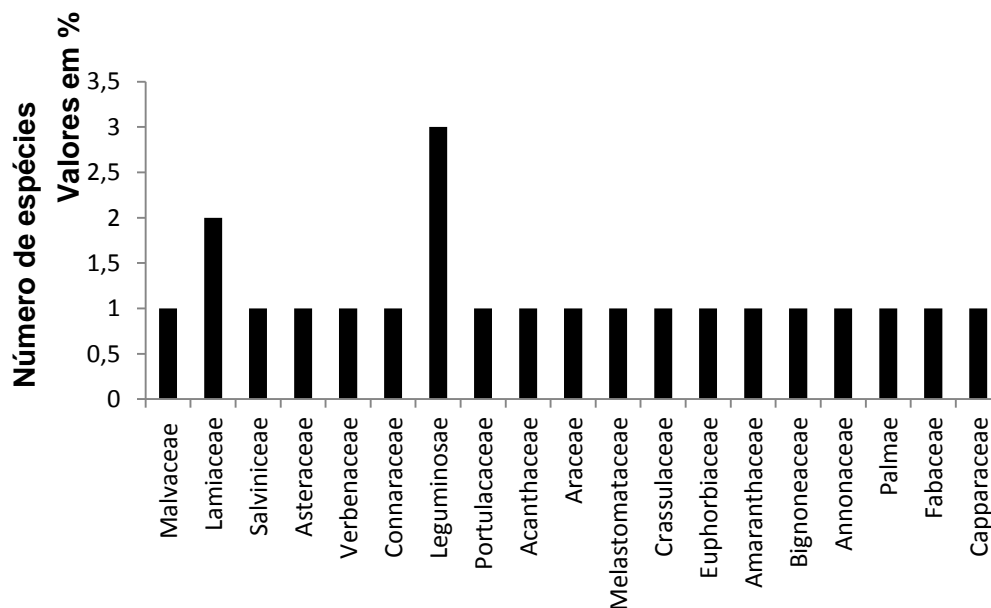
**Tabela 01.** Plantas antiofídicas citadas pelos moradores das comunidades de São Pedro, Cucurunã, Alter do Chão e Mercado de plantas de Santarém-PA.

Nome popular	Nome científico	Família	Parte usada	Modo de uso
Algodão roxo	<i>Gossypia</i> sp.	Malvaceae	Folhas	Sumo
Falso Boldo	<i>Plectranthus barbatus</i> Andr.	Lamiaceae	Folhas	Decocção
Marrequinha	<i>Salvinia</i> sp.	Salvinaceae	Folhas	Decocção
Japana	<i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl.	Asteraceae	Folhas	Decocção
Salva de Marajó	<i>Lippia grandis</i> Schau.	Verbenaceae	Folhas	Decocção e banho de asseio
Verônica	<i>Connarus favosus</i> Planch.	Connaraceae	Entrecascas	Garrafada/tintura
Vinhático	<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.	Leguminosae-Mimo.	Casca	Tintura
Amor crescido	<i>Portulaca pilosa</i>	Portulacaceae	Folhas	Decocção/infusão
Mutuquinha	<i>Justicia</i> sp.	Acanthaceae	Folhas	Decocção
Cipó de Tracuá	<i>Philodendron megalophyllum</i> Schott.	Araceae	Cipó	Macerado
Muúba	<i>Bellucia dichotoma</i> Cogn.	Melastomataceae	Entrecasca	Decocção
Jucá	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P Queiroz var. férrea	Leguminosae-Caesalp.	Sementes	Decocção
Corama	<i>Kalonchoe brasiliensis</i>	Crassulaceae	Folhas	Pasta
Maniva de veado	<i>Manihot</i>	Euphorbiaceae	Folhas	Decocção
Perpétua do mato	<i>Alternanthera brasiliiana</i>	Amaranthaceae	Flor	Infusão
Erva paracari	<i>Marsypianthes chamaedry</i> Kuntz	Lamiaceae	Folhas	Maceração
Pau d'arco	<i>Tabebuia barbata</i> (E. Mey.) Sandwith.	Bignoniaceae	Folhas	Decocção
Araticum	<i>Annona montana</i> Macfad.	Annonaceae	Folhas	Sumo
Açaí	<i>Euterpe oleracea</i>	Palmae	Fruto verde	Sumo
Sarabatucu	<i>Machaerium ferox</i>	Fabaceae	Folhas	Sumo

Canafístula	<i>Cassia</i> sp.	Caesalpiaceae	Sementes	Decocção
Catauari	<i>Crateva benthami</i>	Capparaceae	Folhas	Decocção
Cumaru	<i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.)Willd.	Leguminosa-Papi	Sementes	Decocção
Macacaporanga	<i>Aniba fragrans</i> Ducke	Lauraceae	Folhas	Decocção



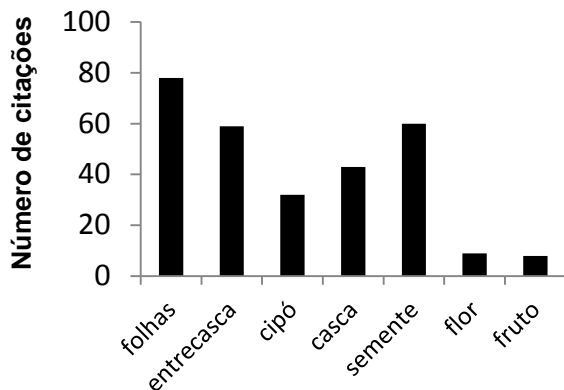
**Figura 01:** Percentual das espécies mais citadas como sendo antiofídica pelos moradores onde foram aplicados os questionários.



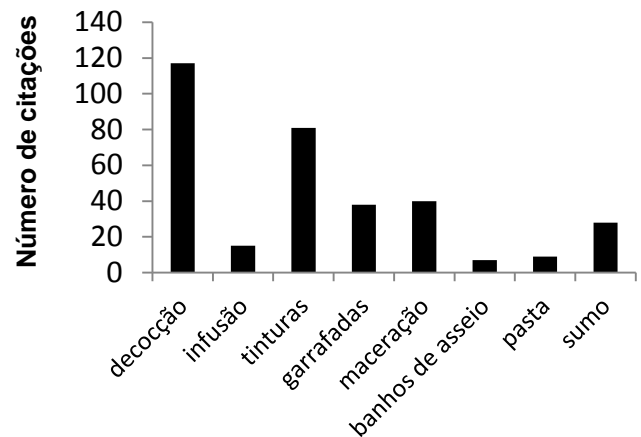
**Figura 02:** Número de espécies antiofídicas por família botânica, citadas nas Comunidades (São Pedro, Cucurunã, Alter do Chão e mercado central de Santarém-PA).

Com relação às partes da planta utilizadas na preparação dos remédios caseiros, todas as partes da planta foram citadas, sendo portanto, as folhas (78%) normalmente mais utilizadas, seguida de sementes (76,92%) entrecasca (75,64%) e cascas (55,12%) (figura 03).

Quanto a forma de preparo são os mais variados tais como chás por decocção e infusão, tinturas, garrafadas, maceração em água, banhos de asseio, pastas e sumos. Porém a forma mais comum de uso de plantas ainda são os chás por decocção e infusão, seguido de tintura (figura 04).



**Figura 03:** Número de citações das partes das plantas utilizadas para o preparo dos remédios caseiros.



**Figura 04:** Número de citações do modo de uso das plantas utilizadas para o preparo dos remédios caseiros.

De acordo com as entrevistas realizadas, foi possível constatar que as plantas citadas são normalmente cultivadas pelos moradores em quintais ou de fácil acesso como em feiras e casas dos vizinhos.

Muitas plantas têm sido citadas na literatura como antiofídicas, porém a maioria destas são recomendadas com base apenas no conhecimento popular. Mors e Melo (10, 19) encontraram na literatura 578 espécies de plantas, pertencentes a 94 famílias, citadas como antiofídicas. Otero Fonnegra e Jiménez (20) relatam que mais da metade dos acidentes ofídicos (aproximadamente 250-300 casos por ano) das regiões de Antióquia e Choco, Colombia são tratados com fitoterápicos e benzeduras. Nestas regiões, eles identificaram 105 espécies de plantas utilizadas como antiofídicas, a metade destas administradas na forma de extratos associados

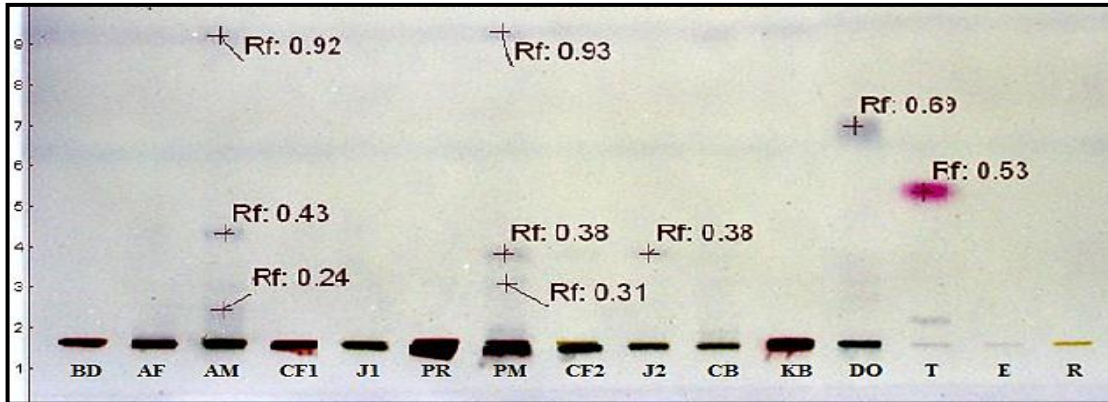
com aguardente. As demais são aplicadas na forma de vapores e banhos externos, muitas vezes mesclando estas formas de uso.

No presente trabalho relatamos o uso de 24 espécies pertencentes a 22 famílias, citadas como antiofídicas pela população de Santarém- PA, sendo que na literatura somente 4 destas espécies (*Kalanchoe brasiliensis*, *marsypianthes chamaedry*, *Plathymania reticulata* e *lippia grandis*) tem algum estudo científico em relação ao seu uso antiofídico.

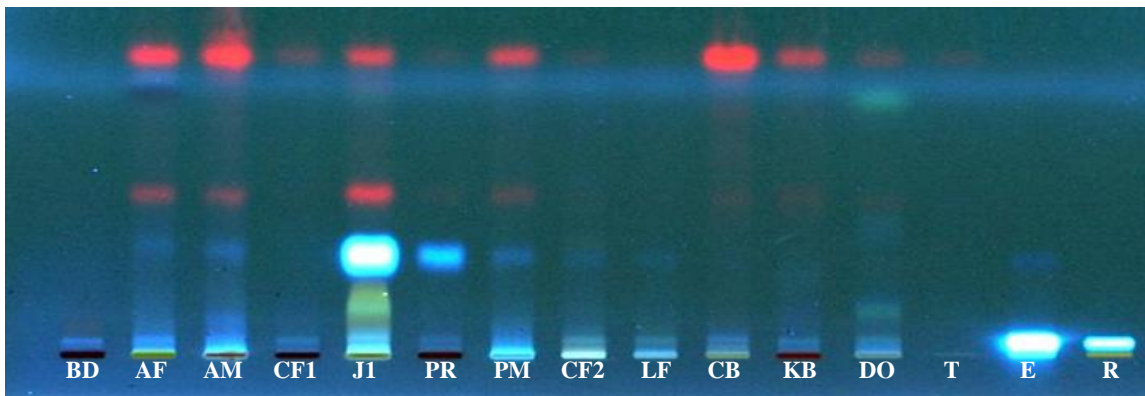
### **Perfis cromatográficos dos extratos**

O perfil cromatográfico é um padrão que representa as características químicas, constituição e autenticidade de uma determinada planta, permitindo comparar semelhanças e diferenças entre as amostras (21). A utilização da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) auxilia na caracterização preliminar dos extratos pela determinação do perfil cromatográfico qualitativo, onde se registram o número, a cor e a posição de manchas na placa (Rf) após sistemas diferentes de eluentes, associados aos reveladores específicos. A partir dessas avaliações, é possível determinar as classes de compostos que estão presentes nos extratos analisados para permitir a posterior correlação com resultados obtidos nos testes de atividade biológica (21).

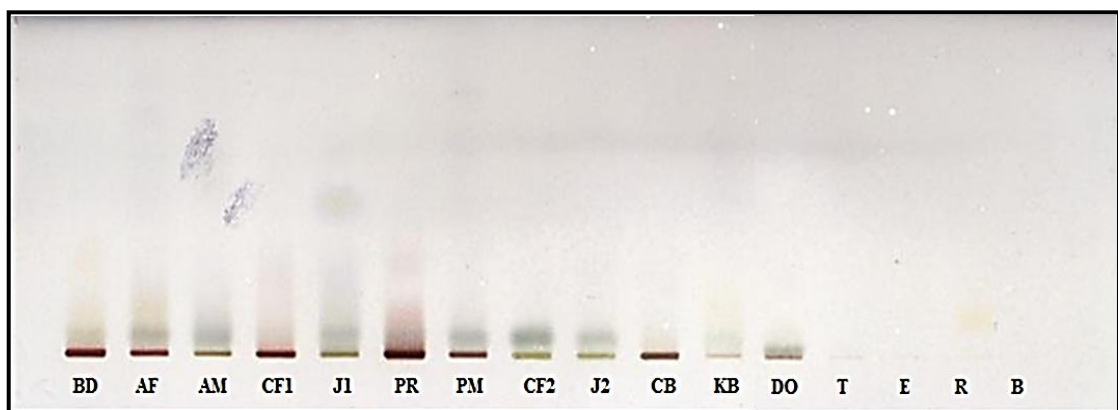
Após as análises em CCD, obteve-se os perfis cromatográficos das 12 amostras de diferentes espécies. Os resultados mostraram que o sistema de eluição apolar não foi um dos melhores sistemas para a caracterização química dos extratos (figura 05), devido a pouca migração das bandas na cromatoplaça, indicando uma alta polaridade dos extratos analisados. Entretanto, para os sistemas polar ácido (figura 06), média polaridade (figura 07) e polar básico (figura 08), observou-se a migração diferencial dos compostos presentes nos extratos, sugerindo a presença de constituintes de média e alta polaridades nos extratos (figuras 09 e 10).



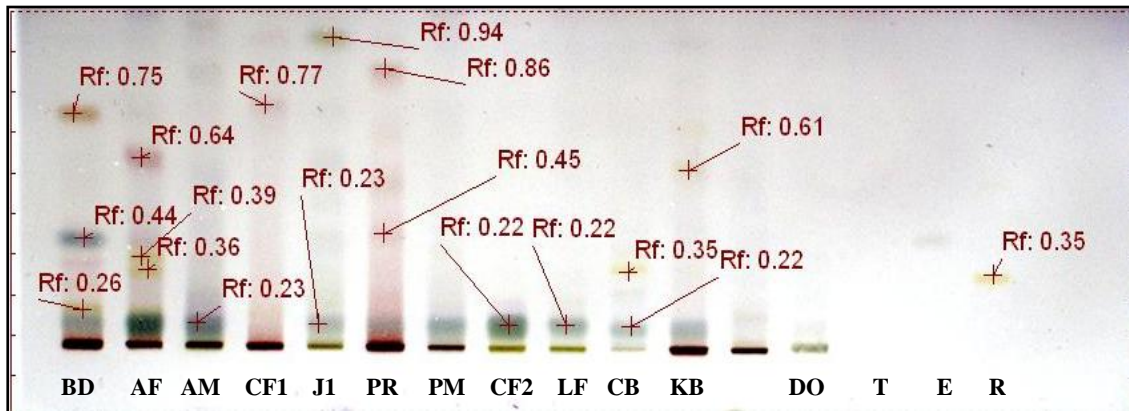
**Figura 05:** Cromatograma das 15 amostras. Onde, BD (*B. dichotoma*), AF (*A. fragrans*), AM (*A. montana*), CF1 (*C. favosus*), J1 (*Justicia* sp), PR (*P. reticulata*), PM (*P. megalophyllum*), CF2 (*C. fistula*), LF (*L. ferrea*), CB (*C. benthami*), KB (*K. brasiliensis*), DO (*D. odorata*), T (timol), E (esculina) e R (rutina). Sistema apolar fotografado em luz visível e derivatizado com VAS.



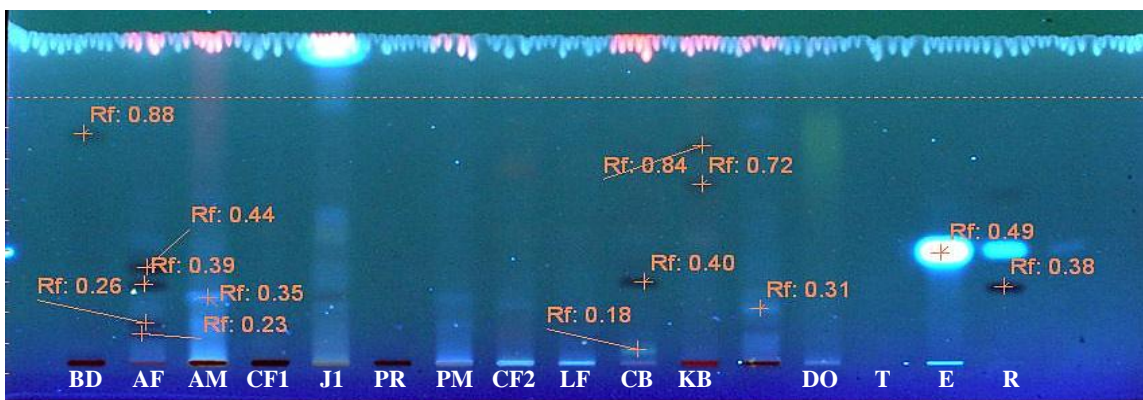
**Figura 06:** Cromatograma das 15 amostras. Onde, BD (*B. dichotoma*), AF (*A. fragrans*), AM (*A. montana*), CF1 (*C. favosus*), J1 (*Justicia* sp), PR (*P. reticulata*), PM (*P. megalophyllum*), CF2 (*C. fistula*), LF (*L. ferrea*), CB (*C. benthami*), KB (*K. brasiliensis*), DO (*D. odorata*), T (timol), E (esculina) e R (rutina). Sistema polar básico fotografado em luz visível 366nm.



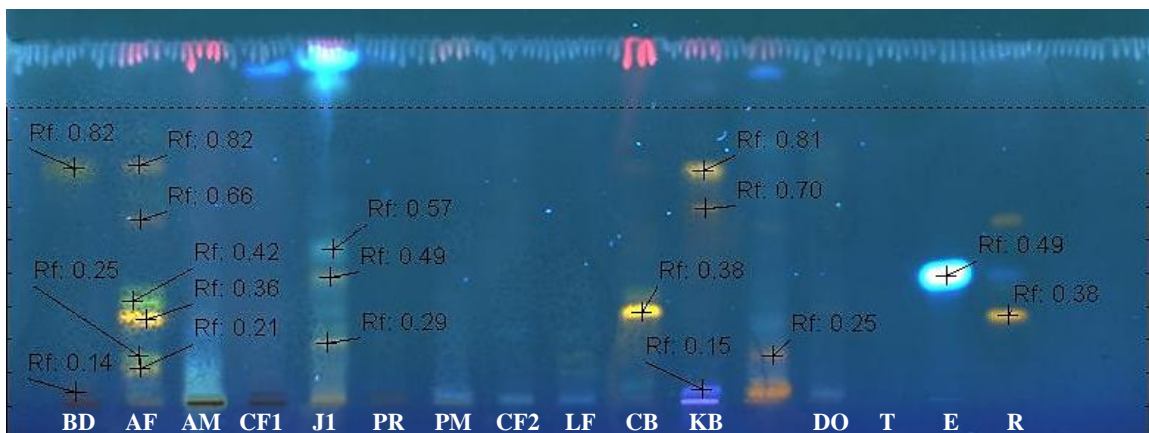
**Figura 07:** Cromatograma das 15 amostras. Onde, BD (*B. dichotoma*), AF (*A. fragrans*), AM (*A. montana*), CF1 (*C. favosus*), J1 (*Justicia* sp), PR (*P. reticulata*), PM (*P. megalophyllum*), CF2 (*C. fistula*), LF (*L. ferrea*), CB (*C. benthami*), KB (*K. brasiliensis*), DO (*D. odorata*), T (timol), E (esculina) e R (rutina). Sistema média polaridade fotografado em luz visível e derivatizado com VAS.



**Figura 08:** Cromatograma das 15 amostras. Onde, BD (*B. dichotoma*), AF (*A. fragrans*), AM (*A. montana*), CF1 (*C. favosus*), J1 (*Justicia* sp), PR (*P. reticulata*), PM (*P. megalophyllum*), CF2 (*C. fistula*), LF (*L. ferrea*), CB (*C. benthami*), KB (*K. brasiliensis*), DO (*D. odorata*), T (timol), E (esculina) e R (rutina). Sistema polar ácido fotografado em luz visível e derivatizado com VAS.



**Figura 09:** Cromatograma das 15 amostras. Onde, BD (*B. dichotoma*), AF (*A. fragrans*), AM (*A. montana*), CF1 (*C. favosus*), J1 (*Justicia* sp), PR (*P. reticulata*), PM (*P. megalophyllum*), CF2 (*C. fistula*), LF (*L. ferrea*), CB (*C. benthami*), KB (*K. brasiliensis*), DO (*D. odorata*), T (timol), E (esculina) e R (rutina). Sistema polar ácido fotografado em luz visível e derivatizado com KOH.



**Figura 10:** Cromatograma das 15 amostras. Onde, BD (*B. dichotoma*), AF (*A. fragrans*), AM (*A. montana*), CF1 (*C. favosus*), J1 (*Justicia* sp), PR (*P. reticulata*), PM (*P. megalophyllum*), CF2 (*C. fistula*), LF (*L. ferrea*), CB (*C. benthami*), KB (*K. brasiliensis*), DO (*D. odorata*), T (timol), E (esculina) e R (rutina). Sistema polar ácido fotografado em luz visível e derivatizado com NP-PEG.



Os resultados da Cromatografia em Camada Delgada podem ser observados na tabela 02. Nesse caso, a idéia foi verificar a presença ou não de ácidos graxos, antraquinonas, cumarinas, flavonóides e terpenóides.

**Tabela 02.** Detecção de classes de substâncias químicas presentes nos EAs pelo método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Onde, BD (*B. dichotoma*), AF (*A. fragrans*), AM (*A. montana*), CF1 (*C. favosus*), J1 (*Justicia* sp), PR (*P. reticulata*), PM (*P. megalophyllum*), CF2 (*C. fistula*), LF (*L. ferrea*), CB (*C.benthami*), KB (*K. brasiliensis*) e DO (*D. dorata*).

Classes de substâncias	Extratos vegetais											
	BD casca	AF folha	AM folha	CF1 casca	J1 folha	PR casca	PM cipó	CF2 semente	LF semente	CB folha	KB folha	DO semente
Ácidos graxos	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Antraquinonas	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Cumarinas	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Flavonóides	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Terpenóides	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-

+ (positivo); - (negativo)

Pelos resultados expostos, observou-se a ausência de ácidos graxos somente no extrato de *C. favosus*. Para a classe das antraquinonas observou-se a presença apenas nos extratos de *Justicia* sp. e *D. odorata*. A presença de cumarinas foi observada nos extratos de *A. montana*, *C. favosus*, *Justicia* sp., *P. megalophyllum*, *C. fistula*, *L. ferrea*, *K. brasiliensis* e *D. odorata*. Os extratos que apresentaram a presença marcante de flavonóides foram *B. dichotoma*, *A. fragrans*, *Justicia* sp., *C. benthami*, *K. brasiliensis* e *D. odorata*. Vale ressaltar que os extratos de *A. fragrans* e *C. benthami* confirmaram a presença do flavonol glicosídico rutina (Rf = 0,38) (figura 10), uma substância intensamente pesquisada, cujos resultados estão interessando constantemente as indústrias farmacêuticas, devido suas diversas atividades farmacológicas (22). Entre as atividades terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede desses vasos (23). Para a classe dos terpenóides observou-se a presença nos extratos de *B. dichotoma*, *A. fragrans*, *C. favosus*, *Justicia* sp., *P. reticulata*, *L. ferrea* e *K. brasiliensis*.

Os resultados obtidos na CCD demonstraram que esse é um método qualitativo adequado para uma análise preliminar de compostos químicos derivados de plantas, devido a economia, rapidez, simplicidade e maior segurança de manuseio do processo, além de ser indicado em diversas Farmacopéias; é um

método muito empregado uma vez que fornece dados para a identificação de matérias-primas vegetais, além de permitir inferências a respeito da pureza do material.

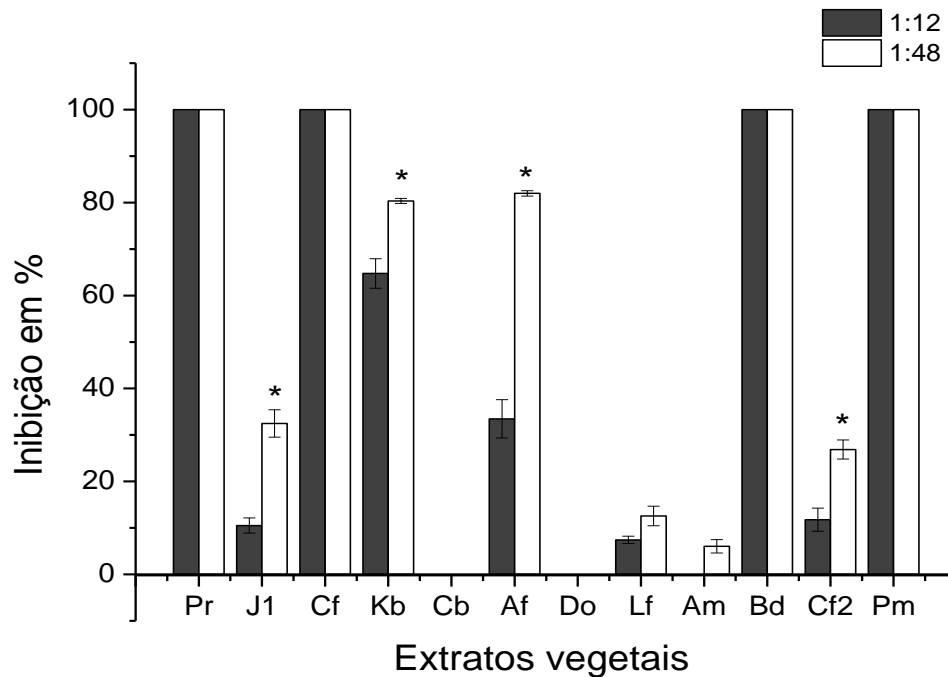
Neste estudo foi observado uma alta diversidade de compostos químicos nos extratos analisados, principalmente nos extratos proveniente de folhas, cascas e sementes justificando assim sua ampla utilização na medicina popular.

### **Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. jararaca***

O efeito dos extratos vegetais oriundos das 12 plantas foi avaliado e estão sumarizados na figura 11. Os extratos de *B. dichotoma*, *C. favosus*, *P. reticulata* e *P. megalophyllum* foram capazes de inibir completamente a hemorragia causada pela peçonha bruta de *B. jararaca* em ambas as proporções avaliadas. Isto sugere que a inibição pode resultar de uma interação entre os compostos dos extratos e metaloproteases presentes na peçonha, ou envolvendo o bloqueio de sítios catalíticos dessas enzimas, ou agindo como quelante de íons metais essenciais para atividade das metaloproteases da peçonha (24). Estes extratos possuem em sua composição química, flavonóides, cumarinas e terpenos os quais podem está influenciando na inibição da atividade hemorrágica causada pela peçonha. Pereira e colaboradores (25) isolaram de extratos de plantas flavonóides, alcalóides, cumarinas e terpenos e observaram que estes reduzem a letalidade causada pela peçonha de *B. jararaca*. Estudos realizados por Castro e colaboradores (27) demonstraram inibição da atividade hemorrágica de *B. asper* por 48 espécies citadas como antiofídicas. Analisando a composição química dos extratos que apresentaram ação anti-hemorrágica, eles relataram a presença de flavonóides, taninos, antocianinas, concluindo que estes compostos poderiam ter sido responsáveis pela inibição da atividade hemorrágica local. Já os extratos de *C. fistulosa*, *C. benthami*, *D. odorata*, *A. montana*, *L. ferrea* e *Justicia* sp. não foram capazes de inibir a hemorragia causada pela peçonha.

Os extratos de *C. fistulosa*, *C. benthami*, *D. odorata*, *A. montana*, *L. ferrea* e *Justicia* sp. não mostraram inibição da hemorragia causada pela peçonha mesmo apresentando algumas ou todas as classes de metabólitos também presente nos extratos que inibiram 100% a hemorragia, indicando que a quantidade ou mesmo o sinergismo entre estes compostos é importante para a atividade biológica. Por outro

lado, os EAs de *A. fragrans* e *K. brasiliensis* apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da hemorragia causada pela peçonha na maior proporção 1:48 de 81,98% e 80,35% respectivamente. Resultados semelhantes com o uso de *K. brasiliensis* para o tratamento da hemorragia local no envenenamento *B. alternatus* foram também constatados por Fonseca e colaboradores (28), corroborando com os resultados aqui apresentados.



**Figura 11:** Efeito neutralizador de EAs contra a atividade hemorrágica causada pela peçonha de *B. jararaca*. A peçonha e o extrato foram pré-incubados por 30 minutos a 37°C em diferentes proporções peçonha:extrato (1:12 e 1:48). Onde: Pr- *P. reticulata*; J1- *Justicia* sp; Cf- *C. favosus*; Kb- *K. brasiliensis*; Cb- *Cratogeomys benthami*; Af- *A. fragrans*; Do- *D. odorata*; Lf- *L. ferrea*; Am- *A. montana*; Bd- *B. dichotoma*, Cf2- *C. fistulosa* e Pm- *P. megalophyllum*. Os resultados expressam a média  $\pm$  SD de quatro experimentos individuais (n= 4) com  $p < 0,05$ , \*valores estes comparados a proporção 1:12.

Em resumo, a pré-incubação dos EAs de *B. dichotoma*, *C. favosus*, *P. reticulata* e *P. megalophyllum* com a peçonha de *B. Jararaca* resultou na neutralização total da atividade hemorrágica desta peçonha e ocorreu com percentuais diferentes para os extratos *A. fragrans* e *K. brasiliensis* revelando diferentes perfis do potencial antiofídico. Embora, as plantas *C. fistulosa*, *C. benthami*, *D. odorata*, *A. montana*, *L. ferrea* e *Justicia* sp. também sejam indicadas pela medicina popular para tratar envenenamentos ofídicos, os extratos preparados nas mesmas condições experimentais não foram capazes de neutralizar a hemorragia causada pela peçonha. Cabe ressaltar, que os extratos vegetais contêm

a presença de flavonóides, cumarinas, ácidos graxos, terpenóides e antraquinonas em diferentes associações, sugerindo que esses compostos possam estar influenciando na neutralização da peçonha seja de forma individual ou em sinergismo. No entanto, estudos farmacológicos utilizando frações dos extratos devem ser realizados, a fim de isolar e caracterizar o princípio ativo responsável pela atividade observada, proporcionando ensaios para a elucidação do mecanismo de ação das toxinas correspondentes.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os comunitários de São Pedro, Cucurunã, Alter do Chão e mercado central de Santarém-PA, por compartilhar o conhecimento popular, a Dra. Regina Célia Viana Martins da Silva do Laboratório de Botânica - Herbário da EMBRAPA, pela identificação botânica. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e a Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES pelo aporte financeiro.

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

1. Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque SA, Haddad VJ. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Ed. Sarvier. 2003.
2. Cardoso JLC, Wen FH, França FOS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in treatment of envenoming by lance-head vipers (*Bothropoides jararaca*) In São Paulo. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v. 86. 1993. p. 315-325.
3. De Paula RC. Efeito de extratos vegetais sobre atividades biológicas do veneno de serpente *Lachesis muta*. [Dissertação de Mestrado]. Niterói (RJ): Programa de Neuroimunologia da Universidade Federal de Fluminense, 2009.
4. Mors WB. Plants against snake-bites. Memória Instituto Oswaldo Cruz., 2: 193, 1991.
5. Maiorano VA, Marcussi S, Daher MAF, Oliveira CZ, Couto LB, Gomes OA, et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. J Ethnopharmacol. 02, 2005, 364–370.
6. Soares AM, Janúario AH, Lourenço MV, Pereira AM, Pereira PS. Snake venom effects neutralizing Brazilian plants. Drugs of the Future, v. 29. 2004.p. 1-13.

7. Oliveira CZ, Maiorano VA, Marcussi S, Sant'ana CD, Januário AH, Lourenço MV, et al. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *J Ethnopharmacol.* 98(1-2): 2005, 213-216.
8. Vilar JC. Ofidismo em Sergipe: epidemiologia e plantas da caatinga utilizadas popularmente como antiofídicas. [Dissertação de Mestrado] Aracaju-SE. Programa de Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal de Sergipe, 2010. 106p.
9. Silva JO, Coppede JS, Fernandes VC, Sant'Ana CD, Ticli FK, Mazzi MV, et al. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra maculosa*. *J Ethnopharmacol.* 100, 2005, 145-152.
10. Mors WB, Nascimento MC, Pereira BMR, Pereira NA. Plant natural products active against snakebite the molecular approach. *Phytochemistry* 55: 1991. 627-642.
11. Melo RF, Farrapo NM, Rocha-Junior DS, Silva MG, Cogo JC, Oshima-Franco Y, et al. Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In: Raymond B. Keller. (Org.). *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*. New York: Nova Science Publishers, 2009. p. 249-262.
12. Borges MH, Alves DL, Raslan DS, Piló-Viloso D, Rodrigues VM, Homsibrandeburgo ML, et al. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *J of Ethnopharmacol*, v. 98, 2005. p. 21 – 29.
13. Magalhães A, Santos GB, Verdam MCS, Fraportid L, Malheiro A, Lima EM, Dos Santos MC. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. *J Ethnopharmacol*, v. 134, 2011. 82-88.
14. Kondo HS, Ikezawa R, Murata A, Ohsaka. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japanese. J. M. Sc. & Biol.* 1960. 13:43-51.
15. Dougherty ER. *An Introduction to Morphological Image Processing*, volume TT9. A publication of SPIE - The International Society for Optical Engineering. 2002.
16. Gonzalez RC, Woods RE, Eddins SL. *Digital Image Processing Using MATLAB*. 2ª Ed. Gatesmark Publishing, Knoxville, TN. 2009.
17. Guerra CE, Xavier AR, Andrade AJN. Watershed Threshold and Gray Level Morphology Applied to Object Detecting in Remote Sensing and Petrographics images; 12º International Congress of the Brazilian Geophysical Society in Rio de Janeiro, Brazil . 2011.
18. Dougherty ER, Lotufo RA. *Hands-On Morphological Image Processing*; College Station, Texas, U.S.A e Campinas, SP, Brazil. 2003.

19. Martz W. Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*. v. 30. 1992. 1131–1142.
20. Otero R, Fonnegra RJ, Jiménez SL. Plantas utilizadas contra mordeduras de serpientes em Antioquia y Chocó, Colombia. Universidad de Antioquia. Medellín, 2000. 402p.
21. Carvalho CMG, Prudente LR, Pereira CA, De Paula JR, Bara MT. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. 3, n. 2, p. 53-62, 2006.
22. Pedriali CA. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. [Dissertação de Mestrado] São Paulo (SP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo. 2005.
23. Pathak D, Pathak K, Singla AK. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. *Fitoterapia*, Amsterdam, v. 57, (5). 1991. p. 371-389.
24. Da Silva JO, Fernandes RS, Ticli FK, Oliveira CZ, Mazzi MV, Franco JJ, et al. Triterpenoids saponins, new metalloproteinase snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra maculosa*. *Toxicon*, v. 50, 2007. p.283-291.
25. Pereira NA, Pereira BMR, Nascimento MC, Parente JP, Mors WL. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. *Planta Medica*. 60: 1994. p. 99-100.
26. Castro O, Gutiérrez JM, Barrios M, Castro I, Romero M, Umaña E. Neutralización Del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Rev. Biol. Trop.* 47 (3): 1999. p. 605-616.
27. Fonseca FV, Melo MM, Silva J, Pereira GP, Dantas-Barros AM. Extratos de *Curcuma longa* L. e *Kalanchoe brasiliensis* Camb. no tratamento local do envenenamento por *Bothrops alternatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 14. 2004. p. 26-29.
28. Oliveira CZ, Maiorano VA, Marcussi S, SANT'ANA CD, Januário AH, Lourenço MV. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *J Ethnopharmacol.* 98(1-2): 2005. 213-216.

## CAPÍTULO II

### **PROPRIEDADES ANTIOFÍDICAS DE EXTRATOS VEGETAIS DA REGIÃO DE SANTARÉM- PA CONTRA A PEÇONHA BRUTA DE *Bothrops atrox*\***

---

\* Capítulo escrito de acordo com as normas da revista The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases (<http://www.scielo.br/revistas/jvatitd/iinstruc.htm>) o qual deverá ser submetido após a tradução para língua inglesa.

## **Propriedades antiofídicas de extratos vegetais da região de Santarém-PA contra a peçonha bruta de *Bothrops atrox***

Moura VM (1), Chalkidis HM (2), Silva AMM (3), Oliveira RB (1), Mourão RHV (1)

(1) Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, UFOPA, Santarém-PA, Brasil. (2) Faculdades Integradas do Tapajós- FIT, Santarém- PA, Brasil. (3) Instituto Butantan, São Paulo-SP, Brasil.

**RESUMO:** As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos no Brasil. A peçonha botrópica induz efeitos locais caracterizados por edema, hemorragia, necrose e dor intensa, além de efeitos sistêmicos graves. Embora a soroterapia seja, ainda, a melhor alternativa para o tratamento dos efeitos sistêmicos do envenenamento, dificilmente neutralizam as reações locais. No presente trabalho foram avaliadas as propriedades antiofídicas de cinco extratos de plantas utilizadas na região de Santarém-PA contra a peçonha de *Bothrops atrox*. Para isto, foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* de neutralização da peçonha bruta de *Bothrops atrox* com extratos aquosos (EAs) de *B. dichotoma* (EABd), *C. favosus* (EACf), *A. fragrans* (EAAf), *P. reticulata* (EAPr) e *P. megalophyllum* (EAPm). Os extratos foram capazes de inibir completamente ou parcialmente os efeitos tóxicos (hemorragia) e farmacológicos/enzimáticos (edema, atividade fosfolipásica e coagulante) induzidos pela peçonha bruta de *B. atrox*. As inibições da peçonha foram ensaiadas com pré-incubação por 30 minutos a 37° C com os EAs em proporções que variaram 1:1 a 1:30 (m:m, peçonha:extrato). Todos os EAs testados apresentaram certo grau de atividade antiofídica, especialmente o EABd que inibiu 100% todas as atividades testadas apresentando uma potencialidade antiofídica.

**Palavras-chave:** envenenamento, inibidores naturais, serpentes.

**ABSTRACT: ABSTRACT:** *Bothrops* snakes are responsible for the largest number of snakebites in Brazil. The venom of *Bothrops* snakes induces local effects characterized by edema, hemorrhage, necrosis and severe pain, and serious systemic effects. Although antivenom is still the best alternative for the treatment of systemic effects of poisoning, hardly neutralize local reactions. In this work were evaluated the antiophidic properties of five plant extracts used in Santarém-PA against the venom of *Bothrops atrox*. For this, were performed *in vitro* and *in vivo* neutralization of crude venom of *Bothrops atrox* with aqueous extracts (AEs) of *B. dichotoma* (AEBd), *C. favosus* (AECF), *A. fragrans* (AEAf), *P. reticulata* (AEPr) and *P. megalophyllum* (AEPm). The extracts were able to completely or partially inhibit the toxic (hemorrhage) and pharmacological/enzyme (edema, phospholipase and coagulant activity) effects induced by crude venom of *B. atrox*. The venom inhibitions were assayed by preincubation for 30 minutes at 37 °C with the AEs in proportions ranging from 1:1 to 1:30 (w:w, venom:extract). All AEs tested showed some degree of anti-venom serum activity, especially AEBd that inhibited 100% all the activities tested, presenting a potential anti-venom serum.

**Keywords:** poisoning, natural inhibitors, snakes.



## INTRODUÇÃO

O envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* produz marcante dano tecidual local que incluem sintomas como dor, edema, hemorragia e necrose, e adicionalmente distúrbios sistêmicos como coagulopatias, hemorragia sistêmica e falência renal (1,2). A variabilidade individual na composição das peçonhas de serpentes é um fenômeno conhecido, explicada pelas condições geográficas, idade da serpente, hábitos alimentares, temperatura, sazonalidade e outras condições (3).

A serpente *Bothrops atrox* é o viperídio mais frequente na região Amazônica, conhecida popularmente por “jararaca-do-norte” representa o principal causador de envenenamentos ofídicos, aproximadamente 90% dos casos notificados (4). As peçonhas dessas serpentes contêm uma grande variedade de proteínas que podem afetar a hemostase por diferentes caminhos. Algumas dessas proteínas não possuem atividade enzimática, tais como: lecitinas tipo-C e desintegrinas, enquanto as nucleotidases, fosfolipases A<sub>2</sub>, serinoproteases e metaloproteases são potentes enzimas que induzem hemorragias locais e sistêmicas, necroses, edema, miotoxicidade entre outras (5).

Acidentes com serpentes peçonhentas são comumente tratados por administração parenteral do soro antiofídico. Ainda que a soroterapia seja capaz de neutralizar os efeitos sistêmicos da peçonha, a neutralização dos danos teciduais locais não ocorre, sendo importante desenvolver um complemento sintético ou natural para a complementação da soroterapia (6).

As Plantas com potencial antiofídico têm despertado crescente interesse no campo de moléculas bioativas usadas como adjuvante à soroterapia no tratamento ou na fisiopatologia do envenenamento. A importância médica e econômica das plantas tem estimulado vários estudos etnofarmacológicos que resultaram na descoberta de interessantes propriedades farmacológicas das plantas (7, 8).

A medicina popular brasileira é rica na descrição e utilização de plantas para combater os vários males entre eles envenenamentos provocados por serpentes peçonhentas. Na região Amazônica, por exemplo, nativos utilizam o macerado de *Pentaclethra maculosa* na forma de cataplasma no local da picada (9). Algumas destas plantas relatadas na medicina tradicional já foram estudadas (10).

As espécies *Bellucia dichotoma* Cogn, *Connarus favosus* Planch, *Plathymentia reticulata* Benth e *Philodendron megalophyllum* Schott são utilizadas na medicina popular de Santarém-PA, para envenenamentos ofídicos. Seus extratos são utilizados em preparações na forma de sumo ou de chás, porém não há estudos científicos que comprovem a capacidade destas plantas na neutralização dos sintomas do envenenamento por serpentes. Este fato, associado à importância das plantas medicinais para a possível descoberta de novos fármacos, justifica a realização de estudos para avaliar os efeitos destas plantas sobre atividades induzidas pela peçonha da serpente *Bothrops atrox*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta e identificação do material vegetal**

As amostras de *P. reticulata* (cascas), *C. favosus* (entrecasca), *P. megalophyllum* (cipó), *A. fragrans* (folhas) e *B. dichotoma* (cascas) foram coletadas em área de savana nas proximidades das comunidades de São Pedro (Brasil, 02°32'08,9" S e 54°54'23,9" W), Cucurunã (Brasil, 02°27'21,0" S e 54°47'45,7" W) e na Fazenda Experimental Curauá (02°33'99,3" S e 54°36'61,2" W), pertencente à Empresa de Peças e Materiais Tecnológicos – PEMATEC no Município de Santarém – Pará, Brasil. Exsiccatas das espécies encontram-se depositadas no Herbário da EMBRAPA/Amazônia Oriental (Belém – PA, Brasil), sob os códigos (IAN): 185215 (*P. reticulata*), 185216 (*C. favosus*), 184899 (*P. megalophyllum*), 184897 (*A. fragrans*) e 1852213 (*B. dichotoma*).

### **Preparo dos extratos aquosos (EAs)**

O material vegetal após limpeza e seleção foi seco em estufa com ventilação de ar forçada a 40 °C (Licit LC–E80), triturados em moinho para obtenção de um pó de granulação com aproximadamente 6 mm de diâmetro. Os EAs foram obtidos a partir de 50 g do pó de cada parte da planta utilizada e extraído com água destilada na proporção de 1:5 (m:v) sob agitação constante de 1.250 rpm á temperatura de 70°C ± 5° por 2:30 horas. Após esfriar, o material foi filtrado resultando aproximadamente em 480 mL de cada extrato de solução aquosa e sendo então, liofilizado (Liotop – L101).

Os rendimentos dos extratos vegetais foram calculados levando em consideração a biomassa seca. *P. reticulata* (10,5%), *C. favosus* (6,7%), *P. megalophyllum* (1,2%), *A. fragrans* (15,4%) e *B. dichotoma* (11,6%). Os extratos foram armazenados a 4 °C e no momento de uso a concentração foi expressa em termos de peso seco/mL.

### **Animais e peçonha**

Para obtenção da peçonha, as serpentes de *Bothrops atrox* foram coletadas na Floresta Nacional do Tapajós – FLONA Km 83, Santarém-PA em parceria com prof. Hipócrates de Menezes Chalkidis da Faculdades Integradas do Tapajós- FIT, SISBIO nº 14018. A peçonha foi coletada *in natura* e liofilizada no laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental.

Grupos de cinco camundongos *Swiss* de ambos os sexos (34-41 g) e ratos *wistar* machos (120-190 g) foram obtidos do biotério da Universidade Federal do Oeste do Pará e do campi de Oriximiná, Santarém-PA. Os animais foram mantidos em condições padrões (temperatura 22 ± 1 °C, ciclo de 12 h claro/12 h escuro) e acondicionados em gaiolas padrões, com água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes da Lei Federal 11.794 de 08/10/2008 que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais e com aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Estadual do Pará (UEPA) sob o protocolo de número 43/11.

### **Protocolo de inibição da peçonha**

A peçonha bruta de *B. atrox* foi dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%) 1 mg/mL e a concentração de proteína determinada pelo método de Bradford (11). Para os experimentos de inibições soluções contendo uma quantidade fixa de proteína de peçonha foram misturadas com diferentes quantidades dos EAs em diferentes proporções (m:m) peçonha:inibidor de acordo com o teste avaliado *in vivo* ou *in vitro*. Todas as misturas foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos e alíquotas foram testadas nos diferentes ensaios, mantendo os seguintes grupos: peçonha bruta + salina (controle positivo), peçonha bruta + extrato vegetal (teste) e extrato vegetal + salina (controle negativo).

### **Atividade hemorrágica**

A hemorragia causada pela peçonha de *B. atrox* foi determinada de acordo com o método descrito por Kondo e colaboradores (12), que consiste na menor quantidade de peçonha que produz um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro (DMH). Primeiramente foi determinado a DMH usando alíquotas de 50 uL de uma solução contendo diferentes concentrações 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µg da peçonha. As amostras foram injetadas i.d. na pele previamente depilada do dorso de Camundongos *Swiss* (n =5), pesando de 34 a 41g sob anestesia leve com éter etílico. Uma hora após a injeção, os animais foram sacrificados, o tecido dorsal foi removido, digitalizado e o halo hemorrágico determinado de acordo com a metodologia descrita abaixo. Para avaliar a ação dos extratos sob a hemorragia causada pela peçonha, os extratos vegetais em duas proporções 1:5 e 1:10 (m:m) foram pré-incubados por 30 minutos 37 °C com uma quantidade fixa da peçonha (2DMH) diluída em NaCl 0,9%. A lesão do halo hemorrágico foi determinada como descrito anteriormente.

### **Determinação do diâmetro médio da lesão hemorrágica**

A medida do halo hemorrágico foi feita através do processamento da imagem do tecido, utilizando-se ferramentas da morfologia matemática (13). A imagem digitalizada (Scanner HP Deskjet F4280) e salva no formato RGB, com a sua resolução e as dimensões do pixel conhecidas. Um Script Matlab (14) foi posteriormente processado de forma a ler a imagem e separar as componentes RGB. Cada componente sofreu um ajuste de contrastes e filtragens, de forma destacar o objeto alvo (halo hemorrágico) em relação ao fundo (tecido e lâmina). A componente que melhor destaca o objeto em relação ao fundo foi escolhida para ser processada. A seguir um operador de Limiarização (15) foi aplicado sobre a componente escolhido de forma a localizar e isolar os pixels que caracterizam o halo hemorrágico. O resultado é uma imagem binária com o objeto isolado. Para eliminar pequenas partículas dispersas e corrigir a forma do objeto destacado, um operador de abertura foi aplicado sobre a imagem binária. Finalmente, o operador de gradiente morfológico é aplicado à imagem binária tratada, de forma a destacar o contorno do objeto. O contorno é colocado sobre a imagem original (RGB) de forma a destacar o halo. Já a área e o diâmetro maior são obtidos do objeto, na imagem

binária, através de contagem de pixels e do cálculo de distâncias (16), sendo que a área do halo hemorrágico obtida foi expressa em mm<sup>2</sup>.

### **Atividade Fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>)**

A inibição da atividade fosfolipásica foi mensurada pela atividade hemolítica indireta em gel de agarose, usando gema de ovo e eritrócitos como substrato. A dose mínima hemolítica indireta (DMHi) foi calculada segundo Gutiérrez e colaboradores (17) e determinada como uma medida da atividade fosfolipase A<sub>2</sub>, definida como a quantidade de proteína que produz um halo mínimo de 10 mm. O efeito neutralizante dos extratos vegetais na hemólise foi avaliado incubando-os previamente por 30 minutos a 37°C com 2DMHi da peçonha bruta nas razões de 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:30 (m:m) 2DMHipeçonha:EAs. Alíquotas de 15 µL contendo as misturas foram aplicadas nos poços sobre as placas de vidro cobertas com a mistura (agarose 1%, gema de ovo e eritrócitos). A atividade enzimática foi expressa como percentual de inibição, onde 100% de inibição corresponde à ausência do halo.

### **Atividade Coagulante**

A atividade coagulante foi calculada de acordo com Assakura e colaboradores (3). Sendo expressa pelo tempo médio de coagulação em segundos de 100 µL de plasma previamente incubados a 37 °C, induzida pela peçonha bruta de *B. atrox*. O tempo necessário para a formação da rede de fibrina na forma de coágulo foi medido em segundos e observado visualmente. Foi determinada a dose mínima coagulante (DMC) que é a concentração de peçonha capaz de coagular o plasma em 60s.

O efeito neutralizante dos EAs na atividade coagulante da peçonha foi avaliado incubando-os previamente com a DMC da peçonha bruta por 30 minutos a 37°C nas proporções de 1:5, 1:10 e 1:20 (m:m) DMC:EAs. Em seguida a mistura foi adicionada ao plasma e a coagulação monitorada como descrito acima. A ausência da rede de fibrina após decorrido um tempo máximo de 10 minutos foi considerado como 100% de inibição.

### **Atividade edematogênica**

Para a determinação da atividade edematogênica da peçonha bruta, foi utilizado o método de Yamakawa e colaboradores (18), com modificações. Inicialmente foi estabelecida a cinética da atividade edematogênica, a peçonha dissolvida em solução de NaCl 0,9% foi injetada no coxim plantar da pata direita posterior de ratos em volume constante de 100 $\mu$ L. A pata esquerda contralateral recebeu igual volume de solução salina estéril (controle). As patas posteriores direita e esquerda de cada rato foram marcadas na região tíbio-társica com caneta retroprojeter. O volume da pata foi medido com uso de pletismômetro manual imediatamente após a administração da peçonha (tempo zero), e em intervalos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 24 horas. O edema de pata foi expresso em mL através da diferença entre o volume da pata no tempo zero e nos demais tempos.

Para determinar a Dose Mínima Edematogênica (DME), que é definida como a menor quantidade de peçonha necessária para induzir 30% de aumento máximo da espessura da pata “experimental”, os animais foram tratados como descrito acima utilizando-se soluções de peçonha nas concentrações de (1,0; 2,5; 5,0; 10 e 20  $\mu$ g/pata).

O efeito neutralizante dos EAs na atividade edematogênica da peçonha foi avaliado incubando-os previamente com 2DME da peçonha bruta por 30 minutos a 37<sup>o</sup>C na proporção de 1:5 (m:m) 2DME:EAs e medindo-se as espessuras dos coxins nos tempos acima mencionados.

### **Análise Estatística**

Os experimentos foram representados graficamente utilizando-se o programa Microcal Origin 8.5 e os valores demonstrados representam a média  $\pm$  desvio padrão (SD). Quando conveniente, o teste estatístico (test t) foi aplicado com valores de  $P < 0,05$  considerados significativos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

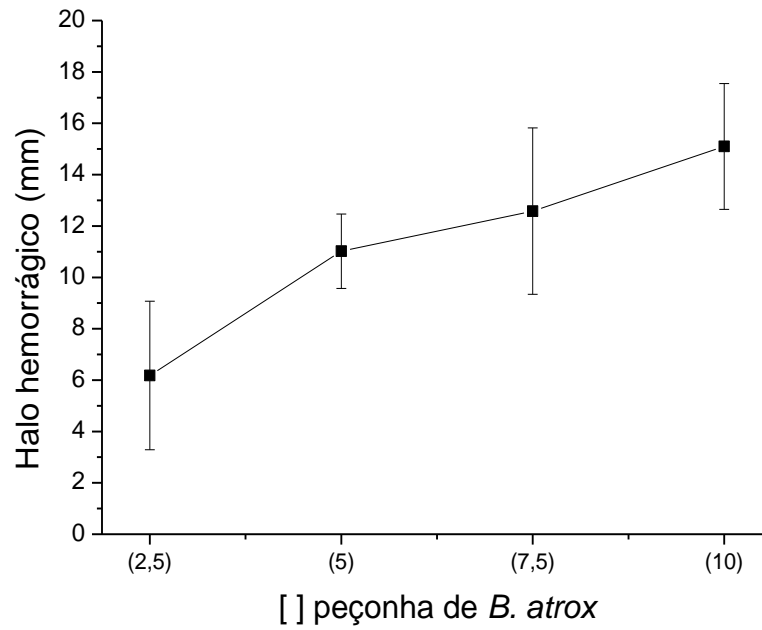
### **Inibição da atividade hemorrágica**

Toxinas hemorrágicas são enzimas responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular ou por alterações na coagulação sanguínea (19). A

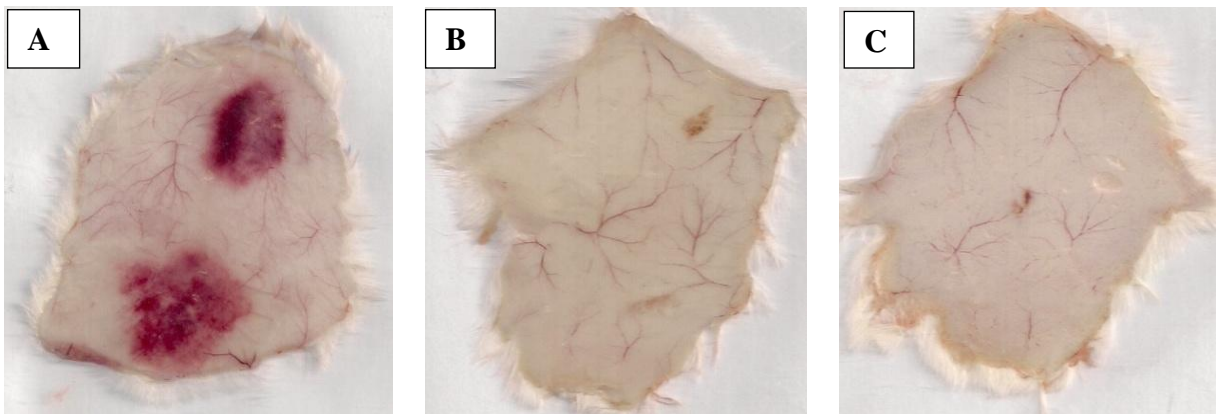
hemorragia causada pela injeção intradérmica da peçonha de *B. atrox* em camundongos ocorreu de forma dose-dependente (figura 1), sendo a dose mínima hemorrágica (DMH) experimental de 5 µg.

A atividade hemorrágica causada pela injeção intradérmica de 2MDH da peçonha bruta de *B. atrox* foi totalmente inibida pelo EABd quando essa amostra foi misturada com a peçonha antes da injeção nas proporções de 1:5 e 1:10 (m:m, peçonha:inibidor) (figura 2). Os demais EAs inibiram significativamente a atividade hemorrágica, *C. favosus* 73,32% (1:5) e 94,45% (1:10), *A. fragrans* 81,89% (1:5) e 92,24 (1:10), *P. reticulata* 70,06% (1:5) e 85,26% (1:10) e *P. megalophyllum* 71,77% (1:5) e 96,58% (1:10) (figura 3).

As metaloproteases são enzimas importantes em quadros de envenenamento e necessitam de íons divalentes para sua ação como zinco (20), assim a atividade de neutralização da ação de metaloproteases pode estar relacionado com a ligação dos compostos químicos dos EAs com esse íon. Alguns compostos isolados de *Schizolobium parahyba* tais como: galocatequina, isoquercitrina, demonstraram ser capazes de neutralizar a ação hemorrágica das peçonhas de *B. alternatus* e *B. moojeni* (21). Segundo Castro e colaboradores (22) taninos e flavonóides são capazes de quelar íons metálicos como o zinco, necessário para a atividade enzimática das metaloproteinases responsáveis pela hemorragia local. Em estudos anteriores também detectamos a presença de flavonóides nos extratos avaliados neste trabalho (dados não publicados) o qual pode está interferindo na inibição da hemorragia causada pela peçonha de *B. atrox*.

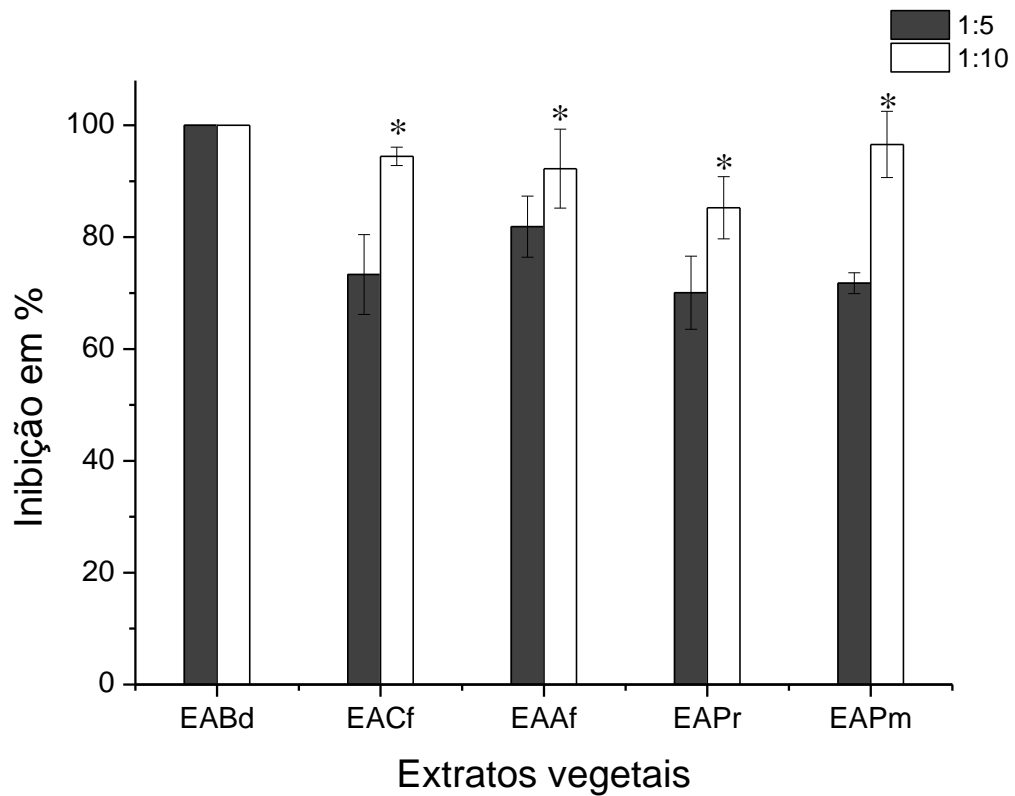


**Figura 01:** Atividade hemorrágica da peçonha de *B. atrox*. Diferentes doses (2,5, 5, 7,5 e 10 µg) da peçonha de *B. atrox* foram injetadas em camundongos e a atividade hemorrágica realizada. Os resultados expressam a média ± desvio padrão de três experimentos individuais n=4.



**Figura 02:** Efeito neutralizador do extrato aquoso da casca de EABd (*B. dichotoma*), frente à peçonha de *B. atrox* em diferentes proporções peçonha:inibidor (m:m). A) 10 µg de peçonha; B) 10 µg de peçonha + 50 µg de EABd (1:5); C) 10 µg de peçonha + 100 µg de EABd (1:10).

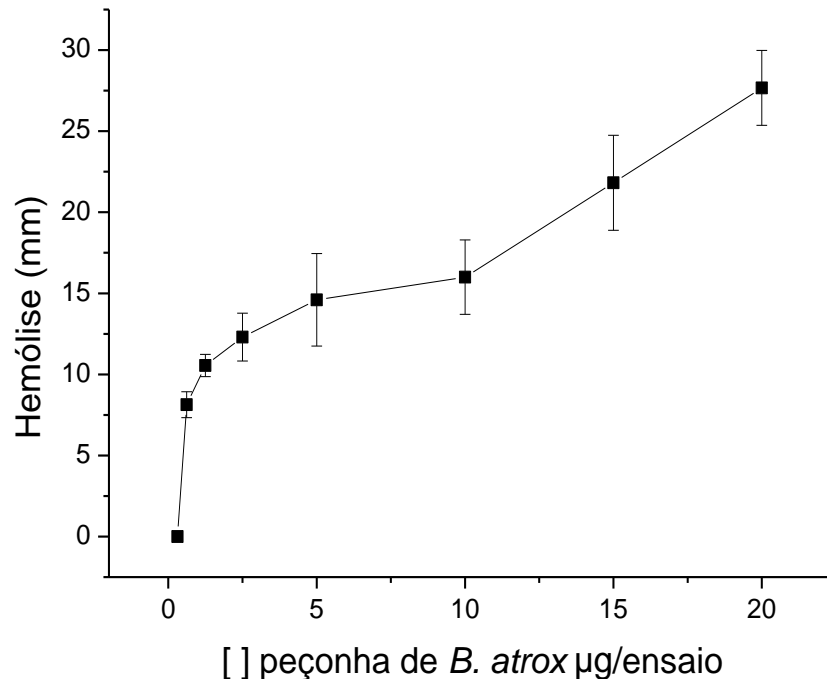




**Figura 03:** Efeito neutralizador de EAs contra atividade hemorrágica causada pela peçonha de *B. atrox*. A peçonha e o extrato foram pré-incubados por 30 minutos a 37°C em diferentes proporções peçonha:planta (1:5 e 1:10). Onde, EABd (*B. dichotoma*); EACf (*C. favosus*); EAAf (*A. fragrans*); EAPr (*P. reticulata*) e EAPm (*P. megalophyllum*). Os resultados expressam a média  $\pm$  SD de três experimentos individuais (n= 5) com  $p < 0,05$ , \*valores estes comparados a proporção 1:5.

### Inibição da atividade fosfolipásica

Em relação a atividade PLA<sub>2</sub> da peçonha de *B. atrox*, a mesma foi capaz de causar hemólise em hemácias lavadas humanas de maneira concentração-dependente (figura 04). A concentração de peçonha que produziu um halo mínimo de 10 mm foi de 1,25  $\mu\text{g}/\text{ensaio}$  e utilizada 2DMHi nos ensaios de neutralização da atividade hemolítica para avaliar a ação dos extratos.



**Figura 04:** Atividade hemolítica indireta da peçonha bruta de *B. atrox*. Diferentes concentrações (0,31, 0,62, 1,25, 2,5, 5, 10, 15 e 20 µg/ensaio) da peçonha foram adicionadas ao meio de reação e a atividade hemolítica realizada. Os resultados expressam a média  $\pm$  SD de quatro experimentos individuais (n=3).

A atividade PLA<sub>2</sub> induzida pela peçonha de *B. atrox* foi totalmente inibida pelos EAs de EABd, EACf e EAPr (tabela 01). Enquanto que o extrato de EAPm não foi capaz de neutralizar a atividade. Por outro lado, o extrato de EEAF inibiu 50% a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha numa proporção de 1:30 peçonha:EEAF (m:m).

Estudos têm demonstrado que extratos aquosos de *Eclipta alba*, *Mandevilla velutina*, *Miconia fallax*, *Miconia albicans*, *Stryphnodendron barbatiman* *Tibouchina stenocarpa* inibem 100% a atividade hemolítica induzida pela peçonha de *Lachesis muta* (20). Maiorano e colaboradores (23) testaram EAs provenientes das raízes frescas ou secas e caules de *Mikania glomerata* e obtiveram inibição de 100% na atividade PLA<sub>2</sub> causada pela peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Os resultados obtidos no nosso trabalho tornam-se ainda mais expressivos quando se compara a proporção utilizada de peçonha: extrato para outras plantas com atividade antiofídica. Para maior concentração de extrato utilizada (5 mg/mL), foi

utilizada uma proporção de 1:2 (peçonha:extrato) na concentração de peçonha (1 mg/mL) obtendo uma neutralização de 100%. Neste mesmo modelo *Marsypianthes chamaedris* inibiu em 75, 79% a atividade fosfolipásica da peçonha de *B. atrox* da região amazônica na razão de 1:14 utilizando uma proporção de (70 mg/mL) de extrato e (5 mg/mL) de peçonha (24). *Mikania glomerata* inibiu em 30% a atividade fosfolipásica da peçonha de *B. jararacussu* a uma razão de 1:200 (p:p) (23).

Portanto, os EAs de EABd, EACf e EAPr também são uma boa fonte de poderosos inibidores naturais de PLA<sub>2</sub> de peçonha de serpente botrópica.

**Tabela 01:** Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *B. atrox* (2,5 µg/ensaio) por EAs de EAPm (*P. megalophyllum*), EAAf (*A. fragrans*), EABd (*B. dichotoma*), EAPr (*P. reticulata*), EACf (*C. favosus*). A peçonha e os extratos foram pré-incubados por 30 minutos a 37°C.

Amostras	Inibição da atividade fosfolipásica (%) <sup>a</sup>						
	Peçonha	1:1	1:2	1:5	1:10	1:20	1:30
<i>Bothrops atrox</i>	00	-	-	-	-	-	-
<i>Bothrops atrox</i> + EAPm	00	00	00	1,98	2	8,5	19
<i>Bothrops atrox</i> + EAAf	00	00	00	00	17	20	50
<i>Bothrops atrox</i> + EABd	00	33	54	100	100	100	100
<i>Bothrops atrox</i> + EAPr	00	40	63	100	100	100	100
<i>Bothrops atrox</i> + EACf	00	49	100	100	100	100	100

<sup>a</sup> A atividade fosfolipásica foi expressa em porcentagem. 100% de inibição corresponde à ausência da atividade da peçonha incubada com os extratos aquosos. Cada experimento representa a média ± SD (n = 4).

### Inibição da atividade coagulante

A dose mínima coagulante (DMC) da peçonha de *B. atrox* foi de 4,5 µg, concentração utilizada nos ensaios de neutralização.

O efeito dos EAs na atividade coagulante da peçonha de *B. atrox* foi avaliado e mostrado na tabela 02. Os EAs de EABd, EACF, EAPr foram capazes de inibir completamente a coagulação causada pela peçonha de *B. atrox*. Maiorano e colaboradores (23) evidenciaram a capacidade do extrato vegetal a partir de folhas, caules e raízes de *Mikania glomerata* para inibir a atividade de coagulação das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. De Paula e colaboradores (25) identificaram inibição de 100% dos EAs de *E. alba*, *S. barbatiman* e *M. velutina* na

atividade coagulante da peçonha de *L. muta*. Estes acidentes por animais peçonhentos costumam produzir hemorragias prolongadas devido a uma degradação considerável de fibrinogênio e outros fatores de coagulação, evitando a formação de coágulos (19). Nossos resultados demonstraram que os extratos de EABd, EACF, EAPr são potentes inibidores da atividade de coagulação, provavelmente devido à interação com as enzimas trombina “like”. No entanto, o mecanismo de ação dos EAs, ainda é desconhecido.

**Tabela 02:** Inibição da atividade coagulante da peçonha de *B. atrox* (4,5 µg) por EAs de EAPm (*P. megalophyllum*), EAAf (*A. fragrans*), EABd (*B. dichotoma*), EAPr (*P. reticulata*), EACf (*C. favosus*). A peçonha e os extratos foram pré-incubados por 30 minutos a 37°C na razão de 1:5, 1:10 e 1:20 (m:m).

Amostras	Atividade coagulante (min) <sup>a</sup>			
	Peçonha	1:5 (m:m)	1:10 (m:m)	1:20 (m:m)
<i>Bothrops atrox</i>	28s ±0,01	-	-	-
<i>Bothrops atrox</i> + EAPm	-	33,2s ± 0,4	47,5s ± 0,4	1min 8s ± 0,4
<i>Bothrops atrox</i> + EAAf	-	33,9s ±0,3	47,8s ± 0,2	1 min 15s ± 0,2
<i>Bothrops atrox</i> + EABd	-	6min 42s ± 0,3	7min 9,2s ± 0,3	+ 10 min ± 0,1
<i>Bothrops atrox</i> + EAPr	-	>10 min ± 0,1	>10 min ± 0,2	>10 min ± 0,1
<i>Bothrops atrox</i> + EACf	-	>10 min ± 0,2	>10 min ± 0,2	>10 min ± 0,2

<sup>a</sup>Cada experimento representa a média ± desvio padrão

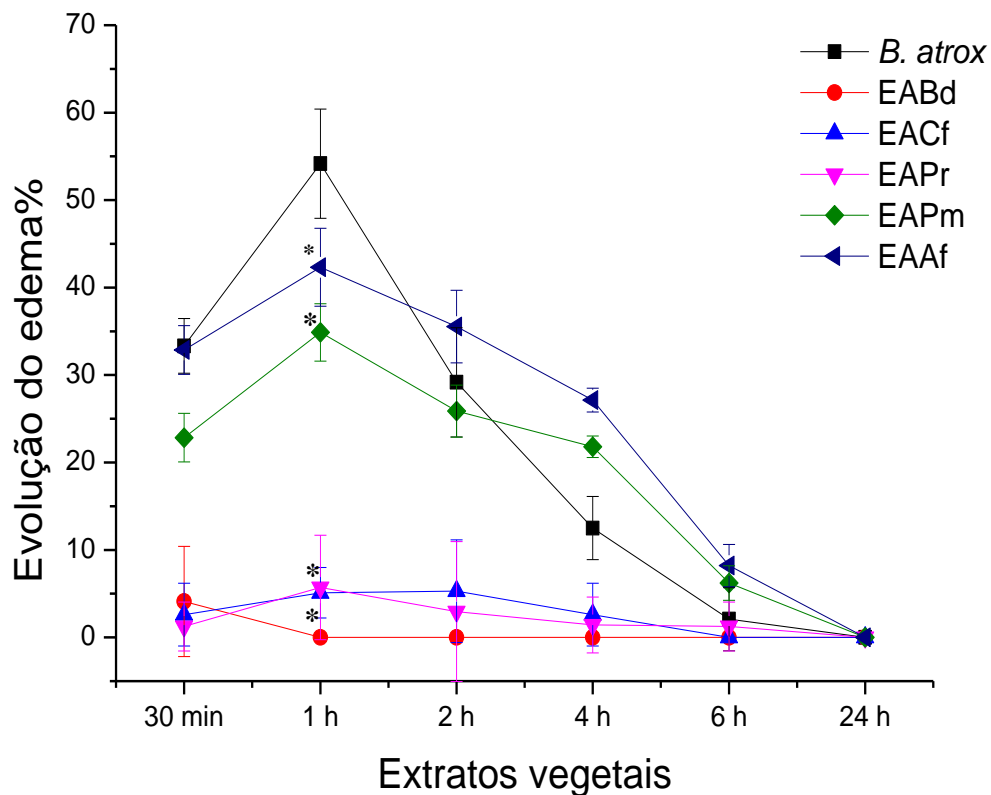
### Inibição da atividade edematogênica

Inicialmente foi feita uma avaliação para os mesmos animais (intra-grupo) entre os diferentes períodos a fim de constatar se a peçonha de *B. atrox* foi capaz de induzir uma resposta inflamatória aguda e determinar a DME. Para a pata direita, na qual foi inoculado somente solução de NaCl 0,9%, não foi detectado aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na espessura da pata para o grupo controle e nem para os grupos experimentais. A DME calculada para a peçonha de *B. atrox* foi de  $5 \pm 0,07$  ug/pata, com ação muito rápida após a injeção, sendo que sua ação máxima ocorre em uma hora e os valores retornam ao normal após o período de 24 horas (figura 5). A inflamação local é uma característica do envenenamento por serpentes da família Viperidea (26). O edema local induzido por peçonhas de serpentes do gênero

*Bothrops* parece ser mediado por substâncias vasoativas como histamina, serotonina além de prostaglandinas e cininas (26).

Conforme observado na figura 5 a peçonha induziu um aumento na pata do animal, porém nos grupos experimentais, inoculados com peçonha e pré-incubados com os EAs de EABd, EACf e EAPr na proporção de 1:5 foi possível observar inibição de 100% do edema produzido pela peçonha logo nos períodos iniciais. Porém, para o EAPm a inibição foi de 41% e o EAAf inibiu em 27%, ambos no período de uma hora. Alcântara e colaboradores (27) mostraram que folhas, caules e raízes de *Peltodon radicans*, uma planta utilizada na região amazônica para picada de cobra, inibiu significativamente a atividade edematogênica da peçonha de *B. atrox* no mesmo modelo experimental. Ticli e colaboradores (28) relataram pela primeira vez a atividade anti-edematogênica do extrato de *Cordia verbenaceae* e seu princípio ativo, ácido rosmarínico.

Dentre os metabólitos de plantas, os flavonóides e terpenóides são provavelmente os mais versáteis. Os flavonóides têm sido considerados como responsáveis pela atividade anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, e muitas outras atividades, como a inibição de atividade enzimática, com ação inibitória da atividade das fosfolipases  $A_2$ , um importante componente dos venenos de serpentes (17). Observamos a presença de flavonóides em extrato de EABd e terpenóides em extratos de EACf e EAPr, sugerindo que estes constituintes químicos podem ser em parte um dos fatores moleculares responsáveis pela ação anti-fosfolipásica  $A_2$  e anti-inflamatória induzida contra a peçonha de *B. atrox*.



**Figura 05:** Efeito neutralizador de EAs contra atividade edematogênica causada pela peçonha de *B. atrox*. A peçonha e o extrato foram pré-incubados por 30 minutos a 37°C na razão de 1:5 peçonha:planta (m:m). Onde, EABd (*B. dichotoma*); EACf (*C. favosus*); EAAf (*A. fragrans*); EAPr (*P. reticulata*) e EAPm (*P. megalophyllum*). \* valores significativos com  $p < 0,05$ .

Os resultados obtidos neste trabalho, indicam que os EACf, EAPr e EABd são capazes de neutralizar totalmente alguns dos efeitos enzimáticos e biológicos provocados pelas toxinas presentes em peçonha de *B. atrox*. Estes resultados reforçam a importância do conhecimento tradicional para a obtenção de novas moléculas ou a complementação a soroterapia em acidentes ofídicos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, a Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES e a Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA pelo aporte financeiro.

## REFERÊNCIA

1. Gutierrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local damage. *Biochemie*. v.82, 2000. 841-850.
2. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, v. 45, 2005. p. 997 – 1011.
3. Assakura MT, Furtado MF, Mandelbaum FR. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). *Comp. Biochem. Physiol.* v.102, 1992 .p. 727-732.
4. Cardoso DF, Yamaguchi IK, Moura-da-Silva AM. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. V. (Org). Ed. Sarvier: São Paulo, 2009. p. 419-431.
5. Perales J, Neves-Ferreira AGC, Valente RH, Domont GB. Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon*, v.45, 2005. p.1013-1020.
6. Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque SA, Haddad VJ. In: *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Ed. Sarvier. 2003.
7. Coe FG, Anderson GJ. Ethnobotany of the Sumu (Uliva) of Southeastern Nicaragua and comparisons with Mikitu plant lore. *Economic Botany*, v. 53,1999. p. 363 – 386.
8. Da Silva JO, Fernandes RS, Ticli FK, Oliveira CZ, Mazzi MV, Franco JJ, et al. Triterpenoids saponins, new metalloproteinase snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon*, v. 50, 2007. p.283-291
9. Da Silva JO, Coppede JS, Fernandes VC, Santa'ana CD, Ticli FK, Mazzi MV, et al. Antihemorrhagic, Antinucleolytic, and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. *J Ethnopharmacol*, v. 100, 2005. p. 145-152.
10. Borges MH, Alves DL, Raslan DS, Piló-Viloso D, Rodrigues VM, Homsibrandeburgo ML, et al. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *J of Ethnopharmacol*, v. 98, 2005. p. 21 – 29.
11. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, v. 2, 1976. p. 248 – 254.

12. Kondo HS, Ikezawa R, Murata A, Ohsaka. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Japanese. J. M. Sc. & Biol. v. 13, 1960. p. 43-51.
13. Dougherty ER. An Introduction to Morphological Image Processing, volume TT9. A publication of SPIE - The International Society for Optical Engineering. 2002.
14. Gonzalez RC, Woods RE, Eddins SL. Digital Image Processing Using MATLAB. 2ª Ed. Gatesmark Publishing, Knoxville, TN. 2009.
15. Guerra CE, Xavier AR, Andrade AJN. Watershed Threshold and Gray Level Morphology Applied to Object Detecting in Remote Sensing and Petrographics images; 12º International Congress of the Brazilian Geophysical Society in Rio de Janeiro, Brazil . 2011.
16. Dougherty ER, Lotufo RA. Hands-On Morphological Image Processing; College Station, Texas, U.S.A e Campinas, SP, Brazil. 2003.
17. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon, v.33, 1995. p. 1405-24.
18. Yamakawa SA, Nozaki M. Hokawa Z. Fractionation of sakishimahabu (Trimeresurus elegans) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions, p. 97-109. In: Ohsaka A, Hayashi K, Saway QY (Eds). Animal, plant and microbial toxins. New York, Plenum, v. 1, 1976. p.555.
19. Markland FS. Snake venom and the hemostatic system. Toxicon, v. 36, n. 12, 1998. p. 1749-1800.
20. De Paula RC. Efeito de extratos vegetais sobre atividades biológicas do veneno de serpente *Lachesis muta*. [Dissertação de Mestrado]. Niterói (RJ): Programa de Neuroimunologia da Universidade Federal de Fluminense, 2009. p. 90.
21. Do Vale, LHF. Neutralização de atividades biológicas das peçonhas de serpentes botrópicas pelo extrato aquoso e compostos isolados de *Schizolobium parahyba* (Fabaceae). [Dissertação de Mestrado] Uberlândia (MG). Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia. 2007. p. 71.
22. Castro O, Gutiérrez JM, Barrios M, Castro I, Romero M, Umana E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes:Viperidae) por extractos de plantas tropicales. Journal of Tropical Biology. v. 47, 1999. p.605-616.
23. Maiorano VA, Marcussi S, Daher MAF, Oliveira CZ, Couto LB, Gomes OA, et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. J Ethnopharmacol. v.2, 2005, p. 364–370.
24. Magalhães A, Santos GB, Verdum MCS, Fraportid L, Malheiro A, Lima EM, Dos Santos MC. Inhibition of the inflammatory and coagulation of *Bothrops atrox*



venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. J Ethnopharmacol, v. 134, 2011. p. 82-88.

25. De Paula RC, Sanchez EF, Costa TR, Martins CHG, Pereira PS, Lourenço MV, et al. Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. v.16, n.2, 2010. p.311-323.

26. Dennis EA. Diversity of groups types regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub> . J. Biol. Chem., San Diego, v.269.n 18, 1994.

27. Alcântara AFC, Silva MC, França RC, Piló-Veloso D. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae). Química Nova, v. 31, n. 4, 2008. p. 744-750.

28. Ticli FK, Hage LIS, Cambraia RS, Pereira PS, Magro AJ, Fontes MRM, et al. Rosmarinic acid, a new snake venom Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitor from *Cordia verbenaceae* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular interaction. Toxicon. v. 46. n. 3, 2005. p. 318-327.

## CAPÍTULO III

### **DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR HPLC-DAD PARA ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO EXTRATO AQUOSO DE *Bellucia dichotoma* Cogn: UMA CONTRIBUIÇÃO QUÍMICA AO ESTUDO ANTIOFÍDICO\***

---

\* Capítulo escrito de acordo com as normas da revista Química Nova. Após conclusão deverá ser submetido após a tradução para língua inglesa. Em construção ([http://quimicanova.sbq.org.br/spec/qn/pt\\_BR/normas.php](http://quimicanova.sbq.org.br/spec/qn/pt_BR/normas.php)).

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR HPLC-DAD PARA ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO EXTRATO AQUOSO DE *Bellucia dichotoma* Cogn: UMA CONTRIBUIÇÃO QUÍMICA AO ESTUDO ANTIOFÍDICO.** *Bellucia dichotoma* Cogn, pertencente à família Melastomataceae, conhecida popularmente como “muúba” é comumente utilizada na medicina popular em Santarém-PA no tratamento de envenenamentos por serpentes botrópicas. As informações científicas na literatura sobre a atividade farmacológica e composição química desta espécie ainda são insuficientes. Neste trabalho relatou-se a contribuição química ao estudo antiofídico de *B. dichotoma* a partir do desenvolvimento de um método por HPLC-DAD para isolamento dos constituintes majoritários do extrato aquoso da casca de *B. dichotoma*.

**Palavras-chave:** *Bellucia dichotoma*, ofidismo, isolamento.

**DEVELOPMENT OF A HPLC-DAD METHOD FOR ISOLATION OF MAJOR COMPONENTS OF AQUEOUS EXTRACT OF *Bellucia dichotoma* Cong: A CHEMICAL CONTRIBUTION TO ANTIOPHIDIC STUDY.** *Bellucia dichotoma* Cogn, belonging to Melastomataceae family, popularly known as "muúba" is commonly used in folk medicine in Santarém-PA in treatment of poisoning by snakes of the genus Bothrops. Scientific information in literature on the pharmacological activity and chemical composition of this species are insufficient. In this work was reported the chemical contribution to study of antiophidic by *B. dichotoma* from the development of a HPLC-DAD method for isolation of major constituents of the aqueous extract from the bark of *B. dichotoma*.

**Keywords:** *Bellucia dichotoma*, snakebite, isolation.

## INTRODUÇÃO

*Bellucia dichotoma* Cong. conhecida popularmente como muúba ou goiaba-de-anta é uma das muitas espécies pertencente à família Melastomataceae. Esta família é constituída por aproximadamente 166 gêneros e cerca de 4.570 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais<sup>1</sup>. No Brasil Melastomataceae é a sexta maior família de angiosperma, sendo encontrada do Amazonas ao Rio Grande do Sul, presente em praticamente todas as formas de vegetação<sup>1</sup>.

Esta família tem sido pouco estudada do ponto de vista fitoquímico e quimiotaxonômico. Embora um grande número de compostos tenha sido isolado, pouquíssimas espécies foram estudadas extensivamente. Os principais constituintes da família Melastomataceae são compostos polifenólicos, especialmente taninos oligoméricos hidrolisáveis de pesos moleculares superiores ou igual a 3800, alguns flavonóides e antocianinas aciladas<sup>2</sup>.

Do gênero *Bellucia*, apenas as espécies *B. grossularioides* e *B. pentamera* foram estudadas do ponto de vista fitoquímico. Segundo Isaza<sup>2</sup> e colaboradores (2007) *B. grossularioides* e *B. pentâmera* apresentaram diferença considerável na composição química, de maneira que a espécie *B. grossularioides* é rica em compostos de média polaridade enquanto que a espécie *B. pentamera* apresenta como composto majoritário o esqualeno<sup>3</sup>.

A espécie *Bellucia dichotoma* objeto deste estudo é pouco estudada e até o momento não existem trabalhos referentes a compostos bioativos isolados. Como esta espécie em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados), mostrou ação neutralizante frente a peçonhas botrópicas, este trabalho teve por objetivo isolar os componentes majoritários do extrato aquoso das cascas de *B. dicothoma* contribuindo com o estudo químico da espécie a qual é largamente usada em acidentes ofídicos na região de Santarém, Pará.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Reagentes e materiais**

Foram utilizados acetronitrila e metanol grau HPLC (Tedia, Brazil<sup>®</sup>) e ácido fórmico P.A. da Isofar. Para filtração do solvente grau HPLC foram usadas membranas de nylon 0,45 µm e 17 mm (Tedia Brasil<sup>®</sup>). A água ultrapura foi obtida através de sistema Direct-Q3 18,2 MΩ.cm (Millipore<sup>®</sup>).

### **Coleta e identificação do material botânico**

As cascas *B. dichotoma* foram coletadas em área de savana nas proximidades das comunidades de Cucurunã (Brasil, 02°27'21.0" S e 54°47'45,7" W) Santarém, Estado do Pará. Uma exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário da EMBRAPA/Amazônia Oriental (Belém – PA, Brasil), sob o código (IAN): 1852213.

### **Preparo do extrato aquoso da casca de *B. dichotoma***

O extrato aquoso (EA) foi preparado a partir de 50 g de cascas secas e trituradas, diluído em água destilada na proporção de 1/5 (p/v) sob agitação constante de 1.250 rpm à temperatura de 70°C ± 5° por 2 horas. Em seguida foi filtrado e liofilizado. O rendimento foi calculado através do resultado do material liofilizado, levando-se em consideração a biomassa seca.

### **Pré-tratamento da amostra para o perfil cromatográfico**

10 mg do extrato foram solubilizados com 2 mL de MeOH e submetidos a banho ultrasônico por um minuto. A solução foi filtrada em membrana de seringa e levada a evaporação total do solvente. Após evaporação, o resíduo foi ressuscitado em 1 mL de MeOH e uma alíquota de 20 µL foi injetado em cromatógrafo líquido.

### **Instrumentação e condições cromatográficas de análise**

As análises foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da marca Shimadzu, modelo Prominence<sup>®</sup>, composto por uma bomba modelo LC-20AT com válvula solenóide com quatro canais, detector de arranjo de diodo modelo SPD-M20A, degaseificador de membrana modelo DGU-20As, auto-injetor de amostras modelo SIL-20A, interface de comunicação modelo CBM-20A acoplado a microcomputador Pentium IV com software de integração LCsolution.

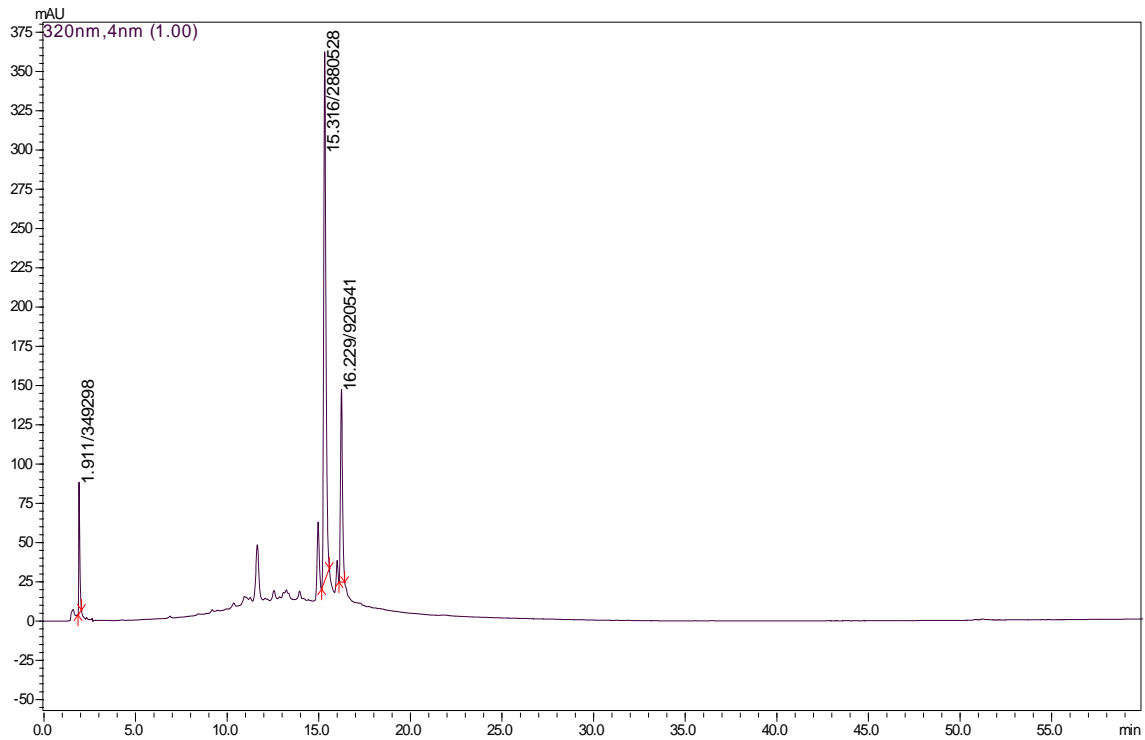
As condições cromatográficas definidas para a separação dos componentes majoritários do extrato aquoso de *B. dichotoma*, compreenderam numa eluição de 40 minutos do tipo isocrática em uma coluna Gemini C18 (250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m) acoplada a uma coluna de guarda C18 (4 x 30 mm, 5 $\mu$ m). A fase móvel consistiu em 83:17 H<sub>2</sub>O:ACN acidificada a 1% com ácido fórmico conduzida pelo sistema a uma vazão de 1 mL/minuto. O comprimento de onda utilizado pelo detector foi de 275 e 288 nm e volume de injeção de 20  $\mu$ L.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Iniciou-se a otimização do método cromatográfico em fase reversa, para o isolamento dos constituintes majoritários do extrato aquoso de *B. dichotoma* a partir do perfil cromatográfico, que compreende em uma eluição gradiente de ampla extensão com fase móvel composta por solvente A = H<sub>2</sub>O e B = ACN, variando-se de 5 a 100% do modificador orgânico, no tempo de 60 minutos de análise e uma vazão de 1 mL/minuto. Como detector utilizou-se o de absorvância na região do ultra-violeta operando na faixa de 200 a 400 nm. A eluição gradiente de ampla extensão é bastante utilizada para se determinar a força da fase móvel a ser usada em eluição isocrática<sup>4,5</sup>.

A metodologia que Snyder *et al.*,(1996) desenvolveu para o uso de gradiente de ampla extensão para servir de guia no desenvolvimento de métodos por HPLC foi utilizada, onde a relação  $(T_{rz} - T_{ra})/T_g$ , deve apresentar valor inferior a 0,4 ou seja, a faixa de retenção deve ser menor que 40% do tempo do gradiente. O perfil cromatográfico do extrato das cascas de *B. dichotoma* apresentou pelo menos 10 picos entre a faixa de tempos de retenção de 8 a 17 minutos, dos quais 3 eram majoritários, sugerindo ser uma amostra de pouca complexidade cromatográfica e ótima para a otimização de uma separação no modo de eluição isocrática. Foi realizado o cálculo para os valores dos tempos de retenção dos picos observados no extrato. Analisado o resultado obtido 0,15, este foi inferior a 0,4 demonstrando que a separação podia ser realizada no modo de eluição isocrático<sup>5</sup>.

Considerando ainda o estudo de Snyder *et al.*,(1996), é possível propor valores desejáveis para o fator de retenção k ( $k = 5$ ;  $k = 10$ ;  $k = 20$ ), baseado nos tempos de retenção da última banda. O tempo de retenção da última banda foi 16,22 minutos (figura 1). Optou-se por uma separação com  $k = 10$ , já que o método foi utilizado para o isolamento.



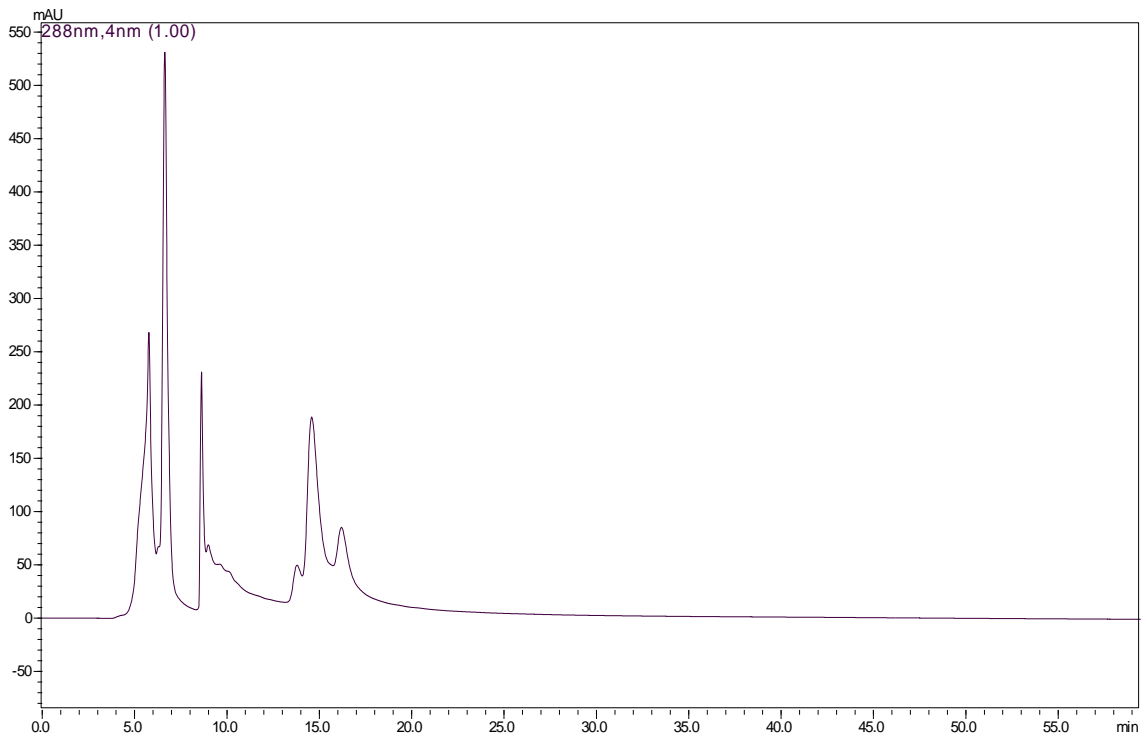
**Figura 01:** Perfil cromatográfico do extrato aquoso da casca de *B. dichotoma*.

O percentual do modificador orgânico (B) proposto por Snyder (tabela 1) para esta separação foi 78:22 H<sub>2</sub>O:ACN (figura 02). Por ser observado o alargamento das bandas nessa análise, a adição de 1% de ácido fórmico na fase móvel foi necessária para uma melhor separação dos picos de interesse (cromatograma com acn acidificada) (figura 3). Embora tenha se encontrado um bom tempo de análise para isolamento (20 min), escolheu-se por enfraquecer a fase móvel aumentando o percentual de água para garantir um melhor fator de separação ( $\alpha$ ) entre os picos de interesse, fixando a fase móvel em 83:17 H<sub>2</sub>O:ACN (1% ácido fórmico) (cromatograma 17% acn acidificada) (figura4) .

**Tabela 01.** Estimativa do % do solvente B para eluição isocrática, baseada no tempo de retenção da última banda  $t_{rz}$  do gradiente inicial (SNYDER *et al.*, 1996)

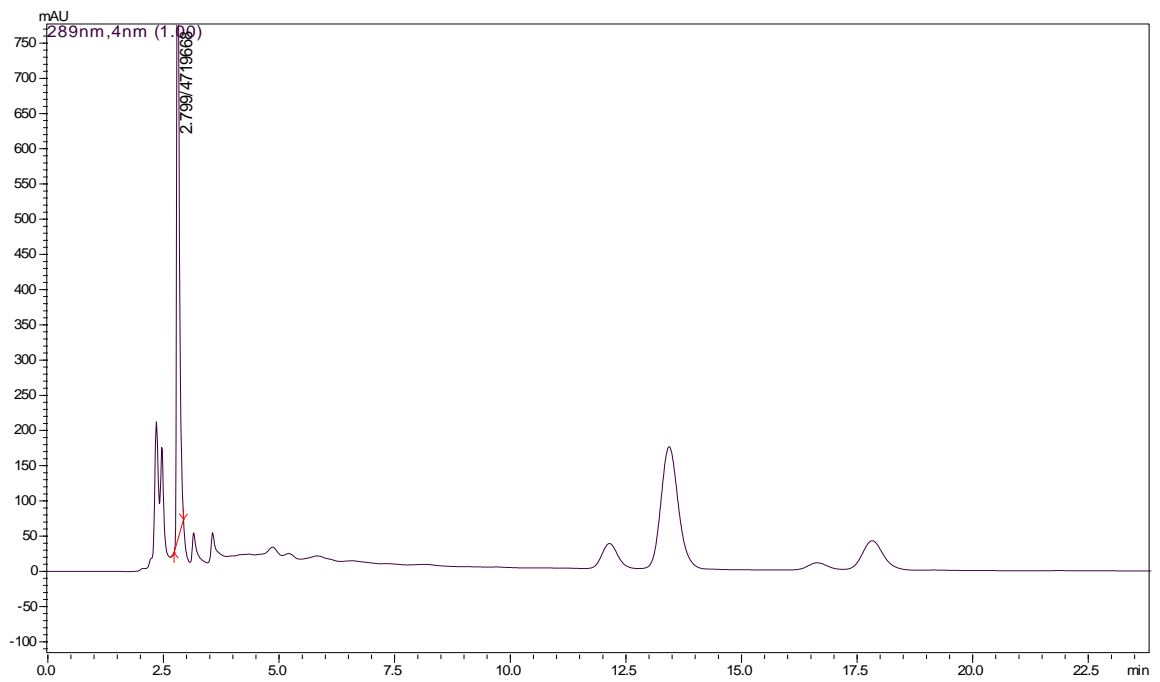
$T_{rz}$ (min)	K=5 (% de ACN)	K=10 (% de ACN)	K=20 (% de ACN)
5	6	0	-
10	19	12	5
15	29	22	14
20	37	30	22
25	45	38	30
30	53	46	38
35	61	54	46
40	69	62	54
45	77	70	62
50	85	78	70
55	93	86	78
60	100	94	86
65	-	100	94

**Condições:** coluna 150 x 4,6 mm; gradiente 5-100% de ACN em 60 minutos; vazão 1 mL/min (SNYDER, 1996).

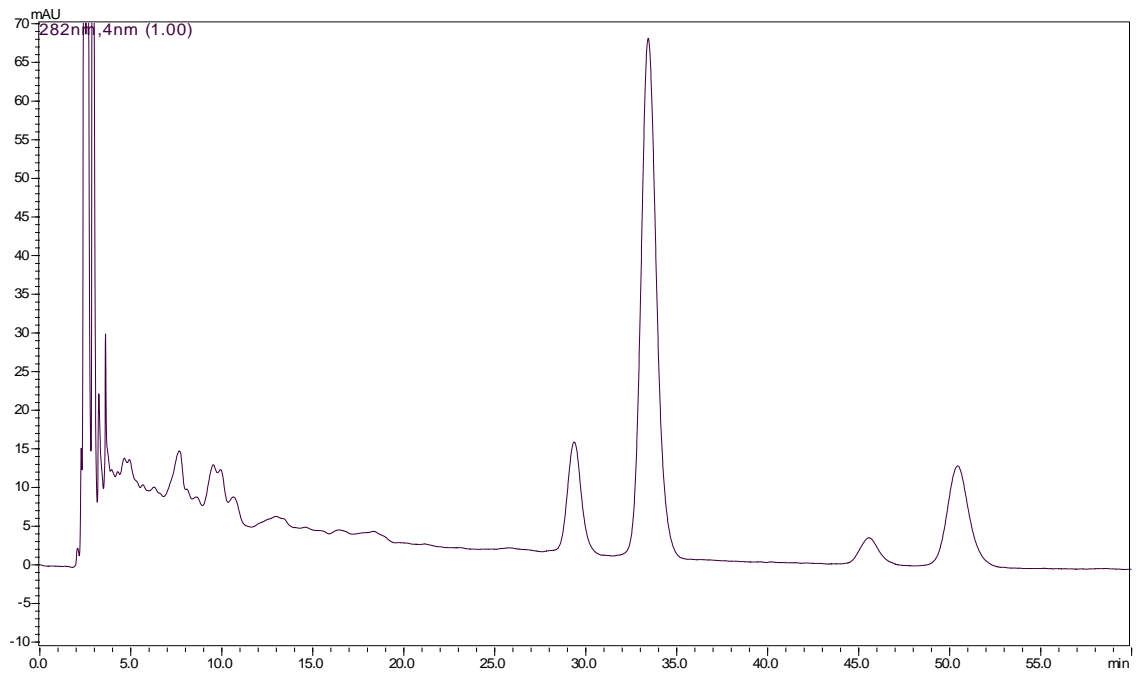


**Figura 02:** Cromatograma do extrato das cascas de *B. dichotoma* 22% de ACN.





**Figura 03:** Cromatograma do extrato aquoso das cascas de *B. dichotoma* (78:22 H<sub>2</sub>O:ACN acidificado com 1% ácido fórmico).



**Figura 04:** Cromatograma do extrato aquoso das cascas de *B. dichotoma* (H<sub>2</sub>O:ACN 73:17 acidificado 1% ácido fórmico).

Foram isolados 68 mg do pico com tempo de retenção de aproximadamente 24 minutos (pico 2 – figura 4). A substância encontra-se em fase de determinação da estrutura.

## **Perspectivas**

Grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos, fazendo com que muitas espécies sejam usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas. Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas.

Diante de tal relevância o estudo fitoquímico da espécie *B. dichotoma* é necessário, pois vem ajudar no conhecimento de constituintes químicos presentes na espécie uma vez que em estudos anteriores esta espécie apresentou um grande potencial antiofídico.

Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, como é o caso de *B. dichotoma*, a análise fitoquímica preliminar indica o grupo de metabólitos secundários relevantes da mesma. Neste caso, o interesse está restrito às substâncias responsáveis pela atividade antiofídica que a espécie apresentou frente à peçonha de *Bothrops atrox* e *Bothropoides jararaca*. A investigação deverá ser biomonitorada, ou seja, direcionada para o isolamento, elucidação estrutural e atividade antiofídica observada em estudos anteriores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romero, R., Martins, A. B. Melastmataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 25, 19, 2002.
2. Isaza M., J. H., Orozco, L. M., Zuleta, L. M., Rivera, D. A., Tapias I., L. J., Veloza, L. A., Ramírez A. Perfis cromatográficos preliminares por GC-MS de espécies de plantas melastomatáceas. *Scientia et Technica*, 33, 359, 2007.
3. Cass, Q. B., Degani, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação, p.46, Ed. UFSCar, São Carlos, 2001.
4. Cass, Q. B., Degani, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação, p.46, Ed. UFSCar, São Carlos, 2001.
5. Snyder, L. R., Dolan, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development I. Use of a starting gradient run. *J. Chromatogr. A*, 721, 3, 1996.

## SÍNTESE INTEGRADORA

A seleção etnofarmacológica de plantas para pesquisa e desenvolvimento de produtos naturais, baseada na alegação feita por seres humanos, pode ser um valioso atalho para a descoberta de novas moléculas. Os resultados obtidos neste estudo, demonstraram que extratos vegetais são capazes ou não de neutralizar os efeitos causados por peçonhas botrópicas contribuindo para validar o conhecimento popular ao mesmo tempo que abre oportunidade para o desenvolvimento da região.

As propriedades farmacológicas e biológicas de espécies da biodiversidade brasileira, já extensamente utilizadas por nativos e índios, devem ser validadas cientificamente para ampliar as possibilidades de tratamento em acidentes ofídicos. Nesse estudo a partir do levantamento etnobotânico foi possível verificar que 24 espécies são utilizadas como antiofídicas pelos moradores de Santarém –PA. Do total das espécies citadas foi possível analisar 12 extratos os quais apresentaram graus diferentes de inibição contra os efeitos causados pela peçonha bruta de serpentes do grupo botrópico.

Entre os extratos analisados a espécie *Bellucia dichotoma* apresentou 100% de inibição frente as atividades hemorrágica, coagulante, edematogênica e fosfolipásica casuada pela peçonha bruta de *B atrox*. Este trabalho pode ser a base para o incremento da soroterapia e a confirmação do uso popular, contribuindo desta forma para o uso de forma racional da biodiversidade da Amazônia.

Vale ressaltar ainda, que este estudo foi a base para a implantação de novas metodologias no Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental-UFOPA, formação de alunos de graduação e Pós Graduação e consolidação de parcerias.

Esse trabalho apesar de concluído continua em andamento. O extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* encontra-se em fase de isolamento para elucidação estrutural, mecanismo de ação e biomonitoramento.

## **ANEXOS**

ANEXO A - Questionário utilizado no levantamento etnobotânico

ANEXO B - Termo de consentimento

ANEXO C - Autorização comitê de ética para uso de animais



Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA  
Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental

## QUESTIONÁRIO

RAIZEIRO (INFORMANTE):

Nome: \_\_\_\_\_

Comunidade: \_\_\_\_\_

Especialização:

\_\_\_\_\_

1) Os acidentes ofídicos são frequentes em sua comunidade?

SIM

NÃO

2) Você conhece ou já utilizou alguma planta que sirva para picada de serpente?

SIM

NÃO

3) Se sim, qual o nome dessa planta? \_\_\_\_\_

4) Que parte da planta você utiliza? \_\_\_\_\_

5) Como ela é utilizada?

\_\_\_\_\_

6) Onde pode ser encontrada?

\_\_\_\_\_

7) Outras plantas que conhece ou utiliza?

\_\_\_\_\_

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS  
INDUZIDAS POR PEÇONHAS BOTRÓPICAS**

**Pesquisadores:** Dra. Rosa Helena Veras Mourão - UFOPA  
Valéria Mourão de Moura – UFOPA

### **1. Introdução**

As informações contidas no presente documento descreverão os propósitos da pesquisa e o papel que você terá como participante. A equipe responsável responderá a quaisquer dúvidas que você possa ter a respeito do termo de consentimento e sobre os objetivos do presente estudo. Por favor, leia-o com atenção.

### **2. Propósitos da pesquisa**

Realizar estudo etnobotânico das espécies vegetais utilizadas na medicina popular de Santarém-PA para acidentes ofídicos.

Avaliar o potencial antiofídico das espécies mais citadas no levantamento etnobotânico para acidentes ofídicos.

### **3. Justificativa**

Uma vez que os acidentes ofídicos são um sério problema de saúde pública, principalmente na região Norte onde o acesso a soroterapia é ineficiente. Torna-se imprescindível a busca por novos agentes antiofídicos para combater envenenamentos por serpentes botrópicas.

### **4. Procedimentos para obtenção de dados**

As informações serão obtidas através de entrevistas, onde garantimos a identidade confidencial dos entrevistados.

#### **4.1 Desconforto ou riscos**

Não haverá nenhum desconforto ou risco para os entrevistados, sendo os mesmos beneficiados com a divulgação dos resultados da pesquisa, que contribuirá com a conscientização em torno do uso de extratos vegetais para envenenamentos ofídicos.

#### **Informações**

Os entrevistados têm a garantia do esclarecimento de quais quer dúvidas à respeito de todas as etapas da pesquisa, incluindo os resultados obtidos no final do experimento

#### Retirada do consentimento

O entrevistado tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar da pesquisa.

#### Termo de Consentimento

Eu,

\_\_\_\_\_, RG nº

\_\_\_\_\_, certifico que tenho lido as informações acima e, esclarecido de todos os itens, estou plenamente de acordo com a pesquisa. Assim, autorizo minha participação no trabalho proposto acima.

Santarém, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010.





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

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo N° 43/11

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

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

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

Data do Parecer: 17/10/11.

**PARECER**

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

Parecer: **APROVADO**

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

Belém, 17 de outubro de 2011.

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

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