



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

POTENCIAL ANTIOFÍDICO DE TANINOS ISOLADOS DE
Plathymenia reticulata Benth. (Fabaceae) **SOBRE AS PRINCIPAIS**
ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E BIOLÓGICAS INDUZIDAS
PELA PEÇONHA DE *Bothrops atrox*

WANIA CRISTINA RODRIGUES DA SILVA

Santarém, Pará
Abril de 2014

WANIA CRISTINA RODRIGUES DA SILVA

**POTENCIAL ANTIOFÍDICO DE TANINOS ISOLADOS DE
Plathymenia reticulata Benth.(Fabaceae) SOBRE AS PRINCIPAIS
ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E BIOLÓGICAS INDUZIDAS
PELA PEÇONHA DE *Bothrops atrox***

ORIENTADORA: Dra. ROSA HELENA VERAS MOURÃO

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

Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos. Linha de pesquisa: Bioprospecção de Recursos Naturais da Amazônia.

**Santarém, Pará
Abril 2014**

DEDICATÓRIA

*Dedico essa conquista á minha mãe, Evanilda e ao meu pai João, que são minha fonte de esperança, proteção, alegria, fé, orientação, conforto e amor. O motivo pelo qual eu desejo ser um ser humano melhor. A vocês devo tudo que sou e aprendi. Sem vocês as conquistas seriam impossíveis. O apoio de vocês foi fundamental para minha persistência em direção aos meus ideais. Não é possível descrever com palavras a admiração, a gratidão e o amor infinito que sinto por vocês **pai e mãe**.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dra **Rosa Helena Veras Mourão**, minha orientadora, que não mediu esforços para me ajudar. Obrigada pela orientação criteriosa, atenção dispensada e paciência, mesmo com tantos afazeres, nunca deixou de cumprir sua importante função de orientadora. Agradeço ainda por sua disposição e paixão em orientar seus alunos, sempre com tanta dedicação, cuidado, critério e disciplina, mas principalmente agradeço pela oportunidade e confiança que me ofereceu. Professora Rosa, obrigada por ser essa profissional que batalha, que ama o que faz e por isso faz bem feito!!! **Você é um exemplo de profissional e de ser humano.**

Ao Prof. Dr. **Ricardo Bezerra de Oliveira**, pelo incentivo e confiança que sempre depositou em mim. Obrigada pela oportunidade oferecida na época do meu TCC. Você é um dos grandes responsáveis por eu estar aqui hoje. Muito obrigada pela amizade e carinho que sempre teve comigo!!!

A toda equipe do laboratório de Bioprospecção e Biologia experimental (LabBBex) com os quais passei grande parte desses longos dois anos e sem os quais esses dias não seriam tão alegres, divertidos e especiais. Muito obrigado pela amizade e pelo apoio.

O meu agradecimento mais que especial a duas pessoas que tiveram grande importância tanto no meu trabalho, quanto na minha vida. **Juliana Raposo**, pelo apoio, amizade, incentivo e “coorientação”, por acreditar no meu trabalho e principalmente por sempre estar pronta a me ajudar, seu entusiasmo é contagiante!!! E à **Valéria Mourão de Moura**, pela amizade, confiança e por tudo o que aprendi com você, tanto nas bancadas como um exemplo de amor pelo o que faz, por fazer de tudo pelo meu aprendizado dentro do laboratório, mesmo de longe. **Juh** e **Vava**, vocês tiveram papel fundamental no meu crescimento profissional, podem ter certeza, nunca esquecerei o que fizeram por mim!!!

As minhas queridas Amigas **Luciana, Marissol e Ana Paula**, que dividiram comigo os sufocos das disciplinas, a rotina do laboratório, as limpezas do biotério e os momentos de alegria nesses dois anos de pós-graduação. **Ana** obrigada pela sua doce amizade, pela parceria constante e por ter tornado a rotina do biotério mais simples e divertida. **Lu** obrigada por não medir esforços em me ajudar, por dividir as alegrias e tristezas, mas principalmente por dividir com generosidade o seu conhecimento de uma vida. **Sol**, obrigada por esta sempre torcendo pelo meu sucesso e por ser sempre um exemplo de dedicação e superação.

Leomara, Aline, Adriele e Sandra a vocês o meu agradecimento mais que especial. Muito obrigada por serem a mão estendida quando eu precisa, pela amizade, por todo carinho e apoio.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia – PGRNA, em especial **Lauro Barata, Antônio Carlos Lola, Troy Beldini, Rodrigo Fadini, Keid Nolan, José Mauro, Patrícia Chaves, Gueths e Luiz Reginaldo** pelo conhecimento adquirido. Agradeço ainda à secretária **Rose**, por sempre atender minhas solicitações com gentileza.

Aos meus queridos colegas da turma 2012, com os quais compartilhei dúvidas, dificuldades, mas também momentos de imensa alegria. Em especial à minha turma do

fundão, **Alex, Thuanny, Victor, Margarida, Suelen, Deliane e Jéssica**. A companhia de vocês foi essencial para que esses dois anos fossem mais agradáveis e divertidos.

As minhas amigas da “panela”, os presentes que ganhei na faculdade, **Andreia, Carina, Elenn, Evelin, Evelane, Naiara, Nayana e Poliane**, muito obrigada pela amizade e pelos bons momentos que sempre me proporcionaram, fazendo com que meus dias fossem de muita felicidade, mesmo estando tão longe de mim. Amo muito vocês!!!!

À minha família, pessoas incríveis que sempre tiveram ao meu lado me apoiando e tornando menos árdua a minha caminhada, alcançamos juntos mais uma vitória!!! Em especial minha mãe **Evanilda Rodrigues**, meu Pai **João Barbosa**, e meus irmãos **Walber, Wander, Silvana** (irmã de coração) por me estimularem, amarem, valorizarem as minhas conquistas, respeitarem minhas escolhas e compreenderem a minha ausência. Vocês são parte de tudo que eu alcanço em minha vida, obrigada pela educação que recebi e pela pessoa de bem que vocês me ensinaram a ser!

Não posso deixar de agradecer aos amigos da minha turma Bio 2005, que mesmo seguindo rumos diferentes, nunca deixaram de torcer pelo meu sucesso: **Luiz, Gleiciane, Katty, Ruth, Meive**, vocês não só compartilharam comigo ensinamentos, dúvidas e angústias, mas contribuíram também para que bons momentos ficassem nas lembranças.

À todos os meus amigos. Obrigada por acreditarem em mim, por todo o incentivo e por entenderem minha ausência. Vocês direta ou indiretamente são os responsáveis por muitos momentos de alegria e descontração que fazem a vida valer a pena!

Agradeço às fundações, **CAPES, CNPq e INCTOX** pelo auxílio financeiro, proporcionando a realização do meu trabalho.

Agradeço ao senhor **Deus**, que guia e protege minha vida, pelas oportunidades e conquistas. Por me dar força e coragem para enfrentar os momentos de dificuldade.

O sucesso não é o final e o fracasso não é fatal. O que conta é a coragem de seguir em frente!!!

Autor desconhecido.

RESUMO

SILVA, Wania. **Potencial antiofídico de taninos isolados de *Plathymania reticulata* Benth. sobre as principais atividades enzimáticas e biológicas induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox*.** 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, 2014.

Plathymania reticulata Benth. (Fabaceae), conhecida popularmente como vinhático, é uma espécie de crescente interesse medicinal que apresenta uso popular, principalmente no tratamento de doenças inflamatórias, infecções e hemorragias. As várias atribuições medicinais desta planta desperta o interesse em investigar atentamente sua composição química, pois suas cascas são muito utilizadas em comunidades tradicionais do município de Santarém, Pará, Brasil, para o tratamento de acidentes ofídicos. Os acidentes provocados por serpentes, principalmente do gênero *Bothrops*, leva a uma série de ações locais e sistêmicas em suas vítimas. Neste trabalho foi avaliado o potencial antiofídico de taninos condensados purificados do extrato aquoso de *P. reticulata* frente às atividades enzimáticas e biológicas induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox*. A triagem fitoquímica do extrato aquoso de *P. reticulata* (EAPr) foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). O EAPr foi purificado por meio de cromatografia em coluna utilizando gel Sephadex LH20, o processo cromatográfico resultou em cinco frações principais denominadas de A,B,C,D e E, que foram monitoradas pelas atividades fosfolipásica e hemorrágica da peçonha de *B.atrox*. Em seguida, o EAPr e as frações foram submetidos a ensaios colorimétricos para doseamento das concentrações de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados. A fração E foi definida como taninos condensados de *P. reticulata* (TCPr) e escolhida para continuidade dos ensaios farmacológicos por ser a fração mais potente nos ensaios de biomonitoramento. O TCPr foi avaliado em diferentes protocolos experimentais *in vivo* e *in vitro*. *In vivo*: (1) pré-incubação (2) pré-tratamento (v.o.); (3) pós-tratamento (v.o.) contra as atividades hemorrágica e edematogênica induzidas pela peçonha de *B. atrox*. *In vitro*, testado frente às atividades fosfolipásica A₂ e coagulante com protocolo de pré-incubação. O TCPr inibiu significativamente a atividade hemorrágica induzida pela peçonha quando utilizado o protocolo de pré-incubação e pré-tratamento, no entanto, não houve inibição significativa para a concentração testada no grupo pós- tratamento. Por outro lado, o edema induzido pela peçonha foi significativamente reduzido ($p<0,05$) em todos os protocolos testados. As atividades fosfolipásica e coagulante foram completamente inibidas quando pré-incubadas com a peçonha de *B. atrox*. Os resultados obtidos indicam que o TCPr possui propriedade antiofídica frente a peçonha de *B. atrox*, sugerindo a necessidade de estudos aprofundados que permitam a elucidação química dos taninos isolados bem como o mecanismo de ação.

Palavras chave: *Plathymania reticulata*, *Bothrops atrox*, taninos

ABSTRACT

SILVA, Wania. Antivenin potential of tannins isolated from *Plathymenia reticulata* Benth. on the main enzymatic and biological activities induced by the venom of *Bothrops atrox*. Master's degree in Natural Resources from Amazon. Area of concentration: Bioprospecting and Natural Resource Management from Amazon. Federal University of Western Para. Santarém, 2014.

Plathymenia reticulata Benth. (Fabaceae), popularly known as mahogany, is a specie of growing medical interest that presents popular usage, particularly in the treatment of inflammatory diseases, infections and bleeding. The various medicinal tasks of this plant awakens interest in investigating closely their chemical composition because their bark are widely used in traditional communities of the municipality of Santarém, Pará, Brazil, for the treatment of snakebites. Accidents caused by snakes, mainly of the genus *Bothrops*, results in a number of local and systemic actions on their victims. This study evaluated the potential of antivenin purified tannins from the aqueous extract of *P. reticulata* front of enzymatic and biological activities induced by the venom of *Bothrops atrox*. The phytochemical screening of the aqueous extract of *P. reticulata* (EAPr) was performed by thin layer chromatography (TLC). The EAPr was purified by column chromatography using Sephadex LH20 gel, chromatographic process resulted in five major fractions labeled **A, B, C, D** and **E**, which were monitored by fofolipásic and hemorrhagic activities *B. atrox* venom. Then the EAPR and the fractions were subjected to colorimetric assays for determination of total phenol, total tannins and condensed tannins. The fraction **E** was defined as condensed tannins *P. reticulata* (TCPr) and chosen for continuity of pharmacological tests to be the most potent fraction in biomonitoring tests. The TCPr been reported in different experimental protocols *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*: (1) pre -incubation (2) pretreatment (3) post- treatment against hemorrhagic and edematous activities induced by the venom of *B. atrox*. *In vitro*, tested in the face of phospholipase A₂ and coagulant protocol with pre-incubation. The TCPr significantly inhibited venom hemorrhagic activity induced when using the pre-incubation protocol and pre- treatment, however, no significant inhibition at the concentration tested in the post-treatment group. On the other hand, the edema induced by venom was significantly ($p < 0.05$) in all protocols tested. The coagulant and phospholipase activities were completely inhibited when pre - incubated with the venom of *B. atrox*. The results indicate that the antivenom has TCPr front property venom of *B. atrox*, suggesting the need for in-depth studies to elucidate the chemistry of tannins isolated and the mechanism of action.

keywords: *Plathymenia reticulata*, *Bothrops atrox*, tannins

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO I	xi
LISTA DE FIGURAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	xi
LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO I	xi
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS	xii
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1.1 Acidentes ofídicos	15
1.1.2 Gênero <i>Bothrops</i>	16
1.1.3 <i>Bothrops atrox</i>	17
1.1.4 Peçonha Botrópica	19
1.1.5 Soroterapia	21
1.1.6 Plantas antiofídicas	22
1.1.7 <i>Plathymenia reticulata</i> Benth.	24
1.1.8 Taninos	26
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO I	38
1. Introdução	40
2. Material e métodos	41
2.1 Coleta de material vegetal e obtenção do extrato aquoso	41
2.2 Cromatografia em Camada Delgada	41
2.3 Purificação de taninos do extrato aquoso	42
2.4 Ensaios colorimétricos do extrato e frações	43
2.5 Animais e peçonha	44
2.6 Potencial antiofídico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de taninos condensados de <i>Plathymenia reticulata</i> (TCPr)	44
2.6.1 Atividade Edematogênica	44
2.6.2. Atividade Hemorrágica	45

2.6.3. Atividade Fosfolipásica (PLA ₂)	45
2.6.4 Atividade Coagulante	46
2.6. Análises Estatísticas	46
3. Resultados	47
3.1 Perfil fitoquímico do extrato aquoso de <i>P. reticulata</i> (EAPr)	47
3.2 Purificação de taninos condensados	47
3.3 Ensaio colorimétricos	48
3.4 Inibição da atividade edematogênica	49
3.5 Inibição da atividade hemorrágica	49
3.6 Inibição da atividade fosfolipásica	50
3.7 Inibição da atividade coagulante	51
4. Discussão	51
5. Agradecimentos	54
6. Referências bibliográficas	54
SÍNTESE INTEGRADORA	58
ANEXOS	59

LISTA DE TABELAS CAPÍTULO I

Tabela 01: Rendimento das frações obtidas por cromatografia em coluna.	48
Tabela 02: Concentração de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados no extrato bruto e frações de cascas de <i>P. reticulata</i> .	48
Tabela 03: Inibição da atividade coagulante da peçonha de <i>B. atrox</i> por TCPr.	51

LISTA DE FIGURAS REVISÃO DE LITERATURA

Figura 01: Características das serpentes gênero <i>Bothrops</i> .	17
Figura 02: <i>Bothrops atrox</i> juvenil e adulta.	18
Figura 03: Desenho esquemático das glândulas de peçonha associadas a um aparelho inoculador.	18
Figura 04: Aspectos gerais de <i>Plathymenia reticulata</i> Benth.	25
Figura 05: Mapa com locais de ocorrência natural da <i>Plathymenia reticulata</i> no Brasil.	25
Figura 06: Modelo de estrutura dos taninos hidrolisáveis.	27
Figura 07: Modelo de estrutura do tanino condensado.	27

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO I

Fig. 1: Cromatografia em Camada Delgada do EAPr.	47
Fig. 2: Inibição da atividade edematogênica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i> por TCPr	49
Fig. 3: Inibição da atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de <i>Bothrops atrox</i> por TCPr.	50
Fig. 4: Inibição da atividade fofolipásica da peçonha de <i>Bothrops atrox</i> pelo TCPr	50

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

- BSA= Albomina Sérica Bovina
CC= Cromatografia em Coluna
CCD= Cromatografia em Camada Delgada
CPPI= Centro de Produção e Pesquisas em Imunobiológicos
DMC = Dose mínima coagulante
DME = Dose mínima edematogênica
DMH = Dose mínima hemorrágica
DMHi = Dose mínima hemolítica indireta
EAPr = Extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*
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
KOH= Hidróxido de potássio.
MS = Ministério da Saúde
NP PEG= Difenilboriloxietilamina/ Polietilenoglicol),
PLA₂ = Fosfolipase A₂
SAB= Soro antibotrópico
SABC Soro antibotrópico-crotalítico
SABL= Soro antibotrópico-laquéético
SINAN = Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVMP = (Snake Venom Metalloproteinases)
UFOPA = Universidade Federal do Oeste do Pará
°C = Graus Celsius

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças está associado à medicina popular de diferentes partes do mundo. Culturas dos mais distintos lugares conhecem e utilizam o potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças (Calixto, 2005). Práticas estas que acompanham o homem desde a pré-história e que evoluíram com ele ao longo dos anos (Coutinho *et al.*, 2006).

O interesse pela descoberta de extratos vegetais com diferentes atividades biológicas tem aumentado consideravelmente. Neste contexto, plantas que apresentam atividade antiofídica são de grande interesse visto que, os acidentes ofídicos são um importante agravo à saúde em diversas regiões do mundo. Por isso, são considerados pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada, com incidência global de aproximadamente 5 milhões de acidentes por ano (Gaus *et al.*, 2013). A utilização de plantas no tratamento de acidentes por animais peçonhentos é uma prática comum por vários povos do mundo (Ambikabothly *et al.*, 2011), principalmente em regiões onde o acesso à soroterapia é restrito ou até mesmo inexistente (De Paula *et al.*, 2010).

Muitos extratos de plantas já foram estudados quanto à atividade antiofídica, visando caracterizar substâncias ativas capazes de inibir diversos efeitos locais e sistêmicos provocados por peçonhas de serpentes. Entre os vários estudos de extratos de plantas estão: o extrato aquoso e frações de *Serjania erecta* Radlk. (Sapindaceae) que foram capazes de inibir as atividades tóxicas de miotoxinas isoladas de *Bothrops jararacussu* (Fernandes *et al.*, 2011); o extrato aquoso de *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) inibiu a ação da peçonha de quatro espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (Borges *et al.*, 2001), e mostrou eficácia contra a atividade fosfolipásica induzida pelas enzimas crotoxin, bothropstoxin-I piratoxin-I e myotoxin-II isoladas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops pirajai*, e *Bothrops moojeni* (Cavalcante *et al.*, 2007). O extrato aquoso de *Casearia mariquitensis* Kunth. (Flacourtiaceae) inibiu os efeitos hematológicos e hemostáticos induzidos por metaloproteinase de classe P-I (neuwiedase) isolada da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Izidoro *et al.*, 2003). Maiorano *et al.* (2005) testaram o potencial antiofídico do extrato aquoso de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) frente às atividades fosfolipásica, edematogênica e coagulante das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops altenatus*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu*, assim como o extrato etanólico de *Mikania laevigata* Sch.Bip.ex Baker (Asteraceae) que também apresentou atividade antiofídica, demonstrando efeito protetor contra a atividade

neuromuscular induzida pela peçonha de *Philodryas olfersii* (Collaço *et al.*, 2012); os extratos etanólicos obtidos de *Heliconia psittacorum* L.f e *Heliconia rostrata* Ruiz & Pav. (Heliconiaceae) mostraram ser eficazes contra a atividade coagulante da peçonha de *Bothrops asper* (Estrada, *et al.*, 2010); a *Marsypianthes chamaedrys* Vahl kuntze (Lamiaceae) apresentou potencial antiofídico contra a peçonha de *Bothrops atrox* (Magalhães *et al.*, 2011), assim como as espécies *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae), *Connarus favosus* Planch. (Connaraceae), *Aniba fragrans* Ducke (Lauraceae) e *Philodendron megalophyllum* Schott (Araceae) cujos extratos foram capazes de inibir as atividades enzimáticas e biológicas induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox* (Moura *et al.*, 2013); Sousa *et al.* (2013) mostraram que frações obtidas a partir do extrato aquoso de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC. (Myrtaceae) foi eficiente na inibição da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops jararaca*.

Ainda, alguns trabalhos indicam que compostos derivados de plantas, tais como o ácido rosmarínico (Ticli *et al.*, 2005; Aung *et al.*, 2010), quercetina (Nishijima *et al.*, 2009), harpalycin (Ximenex *et al.*, 2012), glicirrizina (Assafim *et al.*, 2011), lupeol, (Strauch *et al.*, 2013) Triacetyl p-coumarate (Mendes *et al.*, 2013) são capazes de inibir as atividades biológicas tanto *in vitro* quanto *in vivo* de peçonhas de várias serpentes.

Plathymentia Reticulata Benth. (Fabaceae) tem tradição de uso na medicina popular, sendo uma das espécies mais citadas por moradores de comunidades de Santarém, Pará, Brasil para o tratamento de acidentes ofídicos (Moura *et al.*, 2013). O extrato das cascas é preparado tanto para aplicação tópica quanto ingestão via oral, atuando como anti-inflamatório, anti-hemorrágico, antibiótico (Pott & Pott, 1994) e antiofídico (Farrapo *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2013). Em estudo realizado por Moura *et al.* (2013), verificou-se que o extrato aquoso obtido a partir das cascas de *P. reticulata* foi capaz de inibir efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops atrox*, tais como hemorragia e edema, demonstrando sua propriedade antiofídica. No entanto, ainda são poucos os trabalhos sobre o perfil fitoquímico da espécie direcionado para a obtenção dos compostos responsáveis pela atividade antiofídica, o que justifica a importância do presente estudo. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi realizar triagem fitoquímica de *P. reticulata*, direcionando-a para a obtenção dos compostos responsáveis pela atividade antiofídica frente aos principais efeitos enzimáticos e biológicos induzidos pela peçonha de *Bothrops atrox*.

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 está dividida em: **REVISÃO DA LITERATURA** sobre os aspectos

de acidentes ofídicos, características das serpentes e peçonhas botrópicas, soroterapia e uma revisão sobre plantas medicinais utilizadas como antiofídicas, incluindo a espécie alvo deste estudo *Plathymenia reticulata* Benth, seguida de **OBJETIVOS:** geral e específicos. **A METODOLOGIA e RESULTADOS** foram apresentados em forma de artigo de acordo com as normas do periódico Toxicon (ISSN 0041-0101). Após revisão o mesmo será traduzido para língua inglesa e submetido para publicação.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Acidentes ofídicos

Os acidentes ofídicos estão entre os mais graves problemas de saúde pública, principalmente em regiões tropicais do globo (Koh *et al.*, 2006). A seriedade do problema se dá especialmente pela frequência com que os acidentes ocorrem e pelos graves efeitos sistêmicos que a peçonha provoca nos organismos vivos (Pinho & Pereira, 2001).

O perfil epidemiológico do ofidismo demonstra que a ocorrência desses acidentes está relacionada com fatores climáticos e aumento da atividade humana dos trabalhos no campo (Koh *et al.*, 2006). As vítimas são na maioria do sexo masculino, com picadas localizadas nos membros inferiores e superiores (Pinho & Pereira, 2001) e oriundas principalmente da zona rural e povos indígenas. Em virtude disso, em 2009 o ofidismo foi incluso na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (Gaus *et al.*, 2013).

No Brasil existem cerca de 386 espécies de serpentes, distribuídas em 10 famílias. No entanto, a fauna ofídica de interesse médico esta representada principalmente pelas famílias Viperidae, com 36 espécies e Elapidae, com 22 espécies (Melgarejo, 2009). Essas serpentes são responsáveis por mais de 20.000 acidentes todo ano no país (Sistema Nacional de Agravos Notificados -SINAN, 2014) e estão distribuídas em todas as regiões, podendo ser encontradas nos mais diversos tipos de ambientes, tanto naturais quanto os antropizados.

As serpentes peçonhentas de ocorrência no Brasil estão divididas em quatro grupos de acordo com suas características morfológicas: **grupo I** - Acidente elapídico, as serpentes desse grupo pertencem à família Elapidae e aos gêneros *Leptomicrurus* e *Micrurus*, são conhecidas por corais verdadeiras e apresentam anéis com um padrão de cor característico: vermelho, preto e branco ou amarelo (Brazil *et al.*, 2003); **grupo II** - acidente Crotálico: as serpentes desse grupo pertencem à família Viperidae e ao gênero *Crotalus*, são conhecidas

por cascavéis e possuem como característica marcante um chocalho localizado na região terminal da cauda (Melgarejo, 2009); **grupo III** - acidente Laquético: as serpentes desse grupo pertencem à família Viperidae e ao gênero *Lachesis*, são conhecidas por “surucucu” e “surrucutinga”, possuem como característica principal ponta da cauda com espinho e escamas ouriçadas (França *et al.*, 2006); **grupo IV** - acidente Botrópico, as serpentes do grupo botrópico estão distribuídas em dois gêneros: *Bothropoides* e *Bothrops* e são conhecidos por jararacas, caissaca, urutu, jararacussu (Carrasco *et al.*, 2012).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por cerca de 75% dos acidentes ofídicos ocorridos anualmente no país. No Estado do Pará o problema é ainda mais alarmante, pois além de apresentar o maior número de notificações, com 38.814 acidentes botrópicos registrados no período entre 2001 a 2012, também apresentou uma alta mortalidade relacionada a esses acidentes (Brasil, 2014). Dos 144 municípios do Estado do Pará, Santarém é a cidade com o maior número de notificações, com 1.841 acidentes provocados apenas por serpentes do gênero *Bothrops*, no período de 2001 a 2012 (SINAN, 2014).

Possivelmente esses dados epidemiológicos não correspondem a realidade devido à subnotificações, pois apesar da tecnologia disponível atualmente, ainda vivemos em um período de carência de informações sobre incidência de acidentes ofídicos e morbidades provenientes destes envenenamentos (Albuquerque *et al.*, 2004), isso porque muitas vítimas não conseguem receber atendimento médico preconizado, principalmente em regiões distantes e de difícil acesso.

1.1.2 Gênero *Bothrops*

Pertencente à família Viperidae, o gênero *Bothrops* compreende mais de 30 espécies e subespécies de serpentes (Carrasco *et al.*, 2012). São conhecidas principalmente como jararacas e estão distribuídas nas mais diversas e distintas regiões geográficas da América Central e América do Sul (Campbell & Lamar, 2004).

O gênero é considerado um grupo monofilético que está suportado por cinco sinapomorfias (Carrasco *et al.*, 2012). As espécies do gênero *Bothrops* apresentam fosseta loreal, denticção solenóglifa (Melgarejo, 2009) e pupila do olho elíptica ou vertical. As escamas dorsais são carenadas (formato de "casca de arroz") (Kardong, 1982; Franco, 2009). Além disso, as jararacas possuem a ponta da cauda normal, diferente da cascavel que possui um guizo ou chocalho na porção terminal, ou da surucucu que possui escamas eriçadas e um espinho na ponta da cauda (Figura 01) (Bernarde, 2013).

O gênero *Bothrops* possui uma rica fauna de serpentes com características morfológicas bem diversificadas, abrigando desde espécies raras ou restritas a uma área geográfica limitada, até espécies com distribuição geográfica relativamente ampla e de grande importância para a saúde pública, a exemplo da *Bothrops atrox*, que tem uma distribuição generalizada na região Norte do Brasil, onde é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos notificados (Melgarejo, 2009).

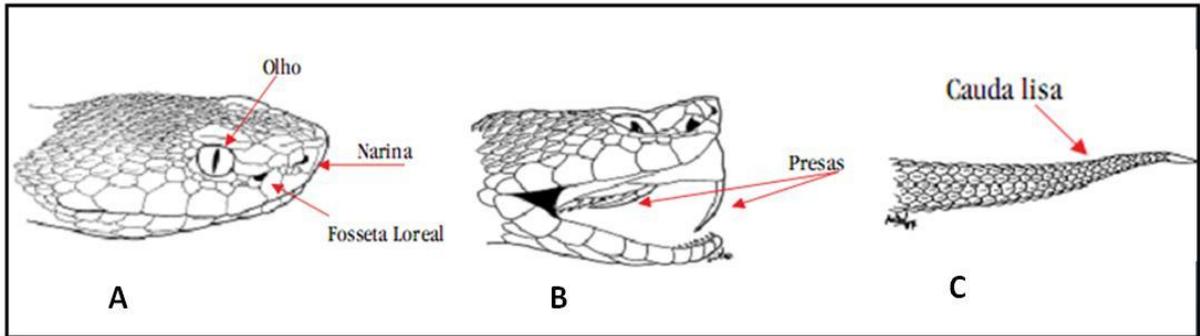


Figura 01: Esquema das características das serpentes do grupo botrópico: A) Fosseta loreal, entre olho e narina; B) Dentição é solenóglifa C) Cauda lisa, sem maiores modificações; (Adaptado do Manual de Diagnósticos e Tratamento de Acidentes Ofídicos por Animais Peçonhentos do Ministério da Saúde, 2001)

1.1.3 *Bothrops atrox*

Bothrops atrox ocorre em todas as regiões tropicais da América Central e América do Sul, com ampla distribuição no norte da Bacia Amazônica (Núñez *et al.*, 2009). É uma serpente que possui grande poder de adaptação (Calvete *et al.*, 2011), por isso suporta bem a alteração no ambiente (Campbell & Lamar, 2004). Trata-se de uma serpente ágil, ativa e muito agressiva, que permanece ativa praticamente em todos os meses do ano, principalmente à noite. Seu habitat pode variar entre matas, locais inundados, córregos, igarapés, beiras de rios e perto de locais propícios à proliferação de ratos (Cardoso *et al.*, 2009). Conhecida popularmente como jararaca-do-norte, é o ofídio mais encontrado na região Amazônica e também considerado o principal causador de acidentes na região Norte, inclusive no município de Santarém, Pará, Brasil (Moura *et al.*, 2013). Esses elevados índices de acidentes provocados por *B. atrox* é um reflexo direto de sua ampla distribuição na região.

Essas serpentes apresentam um colorido cujo padrão de coloração e marcações do corpo variam na configuração e no grau de contraste (Figura 02). São moderadamente pesadas e quando adultas podem chegar a 1,25m de comprimento (Calvete *et al.*, 2011). Assim como as demais serpentes peçonhentas, *Bothrops atrox* apresenta um par de glândulas exócrinas bem desenvolvidas, localizadas junto à margem inferior da mandíbula superior, que são associadas aos dentes (aparelho inoculador) (figura 03) (Kardong, 1982; Franco 2009; Melgarejo, 2009). Esse aparato biológico, que é considerado uma das mais sofisticadas armas do mundo natural, é utilizado principalmente para a captura de presas (Bernarde, 2013), além de representar um eficiente mecanismo na defesa contra predadores e outros inimigos naturais (Mebs *et al.*, 2002).



Figura 02: *Bothrops atrox* juvenil; B) *Bothrops atrox* adulta; Fotos: Paulo Bernarde

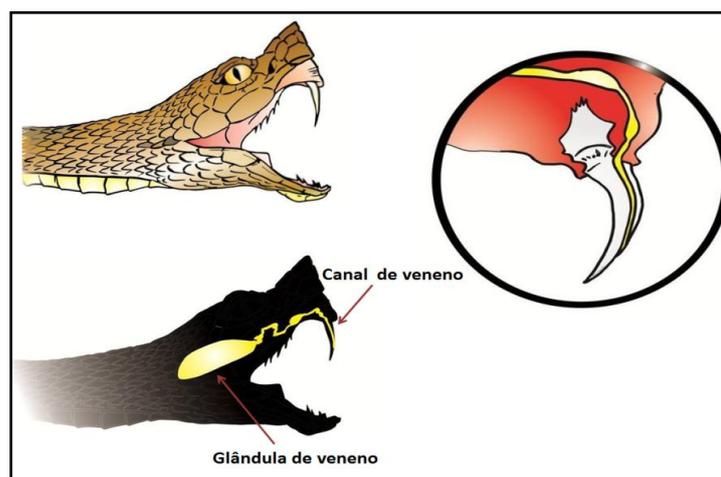


Figura 03: Desenho esquemático das glândulas de peçonha associadas a um aparelho inoculador. Adaptado de Serpentes peçonhentas do Brasil (Melgarejo, 2009).

1.1.4 Peçonha Botrópica

As serpentes usam a peçonha para imobilizar e ajudar a digerir a presa (Lu *et al.*, 2005), no entanto, quando inoculado em humanos, desencadeia importantes atividades fisiopatológicas, com lesões locais, destruição tecidual, hemorragias e distúrbios de coagulação. Essas fisiopatologias podem levar a perda definitiva do tecido e da sua funcionalidade, sendo muitas vezes necessária a amputação do membro atingido (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Gutiérrez & Rucavado, 2000). O acidente pode ser agravado por fatores como, idade e tamanho da vítima; localização, profundidade e número de picadas; a quantidade de peçonha injetada; o tamanho da serpente envolvida; as condições das presas e das glândulas de peçonha; a sensibilidade da vítima e os patógenos presentes na boca da serpente (Russell, 1974).

A peçonha de serpentes é uma mistura complexa de enzimas e polipeptídios farmacologicamente ativos. Sua composição pode variar diferenciando-se entre espécies do mesmo gênero, ou até mesmo com variações intraespecíficas (Guércio *et al.*, 2006), essas diferenças intraespecíficas podem ser em função da idade, sexo do animal, localização geográfica, hábitos alimentares ou até mesmo mudanças de estação, apresentando características particulares tanto na intensidade quanto no mecanismo de ação (Sanches *et al.*, 1992).

As vítimas de acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* apresentam um quadro clínico bastante característico, decorrente da ação combinada de toxinas presentes na peçonha botrópica. Essas toxinas são agrupadas de acordo com as atividades que exercem, que podem ser coagulante, hemorrágica ou proteolítica (Sano-Martins & Santoro, 2009). Entre os componentes da peçonha botrópica as principais enzimas são Serinoproteinases, as Metaloproteinases (SVMP) e as Fosfolipases A₂ (PLA₂s). Essas enzimas estão envolvidas em atividades biológicas específicas, como hemorragia, proteólise, distúrbios na coagulação (Gutiérrez, 2002; Soares & Giglio, 2003) e promovem a degradação de substratos naturais como fibrinogênio e colágeno (Costa, 2010).

As Serinoproteinases sozinhas não são letais, porém, quando associadas a outras proteínas presentes na peçonha contribuem para o efeito tóxico do envenenamento (Costa, 2010). Essas enzimas podem atuar alterando alguns fatores da cascata de coagulação através da degradação proteolítica (Serrano & Maroun, 2005). As serinoproteinases hidrolisam diretamente o fibrinogênio em fibrina, causando uma trombose rápida e eficiente, sem a necessidade da participação da trombina, por isso, algumas são denominadas “trombina-

símili” (Sano-Martins & Santoro, 2009), pois agem diretamente sobre os fatores da cascata de coagulação (Serrano & Moraun, 2005).

As Metaloproteinases de peçonha de serpentes (SVMPs - Snake Venom Metalloproteinase) são as enzimas proteolíticas mais abundantes nas peçonhas botrópicas (Nuñez *et al.*, 2009). Essas toxinas são responsáveis pela hemorragia local e sistêmica observada na vítima, por isso são frequentemente chamadas de fatores hemorrágicos ou hemorraginas (Teixeira *et al.*, 2005). Atuam provocando a ruptura do endotélio vascular, degradando macromoléculas como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV. Possuem ação direta sobre a lâmina basal da microvasculatura, ocasionando a ruptura completa das células endoteliais (Moura-da Silva *et al.*, 2009). Além disso, as SVMPs possuem alto poder de inibir a agregação plaquetária, impedindo a coagulação sanguínea (França & Málaque, 2009).

As Fosfolipases A₂(PLA₂) são enzimas que desempenham importantes funções em processos fisiológicos como na biossíntese de prostaglandinas e leocotrienos, no reparo de membranas, e no auxílio de digestão (Pereira, 2011). Elas atuam sobre a membrana celular realizando a clivagem de lipídeos em ácidos graxos e lisofosfolipídeos (Santos-Filho *et al.*, 2008). Com isso, podem também induzir uma variedade de efeitos farmacológicos adicionais, como desestruturação de membrana, interferência na agregação plaquetária, miotoxicidade, neurotoxicidade, (Gutiérrez & Lomonte, 1997; Kini, 2005) e estimulação de resposta inflamatória local com indução da produção de citocinas, indução de edema e influxo leucocitário (Zychar *et al.*, 2010).

Assim, a fisiopatologia do envenenamento envolve uma complexa série de eventos que vão agir de modo sinérgico ou depender da ação preponderante de uma dessas toxinas. Com isso, afeta processos vitais (Gutiérrez, 2002) e induz a uma variedade de manifestações clínicas sobre a vítima, que podem levar a complicações locais e sistêmicas (França & Málaque, 2009).

O quadro local caracteriza-se por sangramento no sítio de inoculação da peçonha, edema de aparecimento precoce, equimose no local da picada que pode se estender por todo o membro acometido, quadro doloroso de intensidade variável, aparecimento de bolhas com conteúdo seroso, hemorrágico ou necrótico. Esses efeitos locais podem ser atribuídos à presença principalmente das fosfolipases e enzimas proteolíticas (Brasil, 2013).

O efeito sistêmico da peçonha botrópica é caracterizado por um quadro de incoagulabilidade sanguínea, que em nos casos leves ou moderados apresenta-se com pequenos sangramentos, que incluem gengivorragias, hematúria, púrpuras, sangramentos em locais de venopunção, ferimentos com cicatrização recente, hemoptise, epistaxe, sangramento

conjuntival, hipermenorragia e hematêmese. Ainda, em casos graves podem ocorrer hemorragias intensas, insuficiência renal e choque (França & Malaqué, 2009).

1.1.5 Soroterapia

O Ministério da Saúde preconiza que em caso de acidente ofídico seja feito imediatamente a administração endovenosa de soro antiofídico específico, com doses que variam de acordo com a gravidade do envenenamento e com o peso do paciente. O tratamento específico para acidentes botrópicos deve ser feito em ambiente hospitalar e consiste na administração do soro antibotrópico (SAB) ou, na falta deste, das associações antibotrópico-crotálico (SABC) ou antibotrópico-laquético (SABL) (Brasil, 1999).

A produção de soros antipeçonhas ainda se baseia nos métodos originalmente descritos por Vital Brazil, que demonstrou as relações de especificidade existentes entre os soros hiperimunes obtidos e as peçonhas empregados na imunização (Wen, 2009). Atualmente, os soros antiofídicos são produzidos por quatro grandes centros: Instituto Vital Brazil-IVB (RJ), Instituto Butantan-IBU (SP), Fundação Ezequiel Dias-FUNED (MG) e Centro de Produção e Pesquisas em Imunobiológicos- CPPI (PR). Com isso o Brasil alcançou a autossuficiência na produção de soro e estabeleceu mecanismos para a vigilância de acidentes ofídicos em grande parte território nacional (Cardoso *et al.*, 2009).

Segundo Furtado (1991), os soros antiofídicos produzidos no Brasil são: **antielapídico**- capaz de neutralizar a peçonha de serpentes do gênero *Micrurus*, com antígeno de imunização, peçonha de *Micrurus frontalis* (50%) e *Micrurus corallinus* (50%); **anticrotálico** - capaz de neutralizar a peçonha de serpentes do gênero *Crotalus*, com antígeno de imunização peçonha de *Crotalus durissus terrificus*; **antilaquético**- capaz de neutralizar a peçonha de serpentes do gênero *Lachesis*, com antígeno de imunização, peçonha de *Lachesis muta*; **antibotrópico** – soro que neutraliza a peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*, com antígeno de imunização formado pelo pool peçonhas de *B. jararaca* (50%), *B. alternatus* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%); *B. neuwiedi* (12,5%) e *B. jararacussu* (12,5%); **antibotrópico/ crotálico** - pode ser usado para neutralizar a peçonha de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, com antígeno de imunização de peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (40%) e antígeno botrópico (60%); **antibotrópico/ laquético** - pode ser usado para neutralizar a peçonha de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis*, com antígeno de imunização: *Lachesis muta muta* (40%) e antígeno botrópico (60%).

Os soros conseguem reverter com bastante eficácia os efeitos sistêmicos da peçonha no organismo da vítima, evitando na maioria das vezes o óbito do paciente. No entanto,

apresenta algumas desvantagens quanto ao uso. Além da necessidade de cuidados com a estocagem e com o prazo de validade, a soroterapia pode provocar uma série de efeitos colaterais na vítima, tais como reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro (Wen, 2009). Também podem ser ineficientes no combate aos efeitos locais da peçonha, aumentando as chances de deixar sequelas no membro atingido (Cardoso *et al.*, 2009).

Embora já existam soros capazes de neutralizar as peçonhas das serpentes de maior importância médica, o grande problema é que em regiões mais distantes e de difícil acesso não se pode contar de maneira eficaz com o recurso da soroterapia (Wen, 2003; Da Silva *et al.*, 2007). Em virtude disso é muito comum que em comunidades tradicionais as plantas medicinais sejam o único tratamento para as vítimas de envenenamento por serpentes.

1.1.6 Plantas antiofídicas

A utilização de extratos de plantas com propriedades antiofídicas é uma prática utilizada por populações nativas em todo o mundo, antes mesmo do desenvolvimento do soro antiofídico (Ambikabothly *et al.*, 2011). Esse tipo de tratamento é geralmente utilizado com o objetivo de conter os efeitos locais da peçonha como a dor, o edema, a necrose e principalmente a hemorragia (Costa, 2010).

As observações populares sobre o uso e eficácia de plantas com potencial antiofídico têm despertado o interesse de grupos de pesquisas, que além de contribuírem para a divulgação das atividades terapêuticas das plantas, destacam a importância do conhecimento popular para a seleção de espécies com potencial antiofídico (Mors *et al.*, 2000). Com isso, pesquisadores têm buscado por novos compostos de extratos vegetais que possam atuar como complemento a soroterapia, e tentam identificar o mecanismo molecular que inibe a ação das toxinas presentes na peçonha de serpentes (Magalhães *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, várias espécies de plantas foram estudadas com o objetivo de caracterizar substâncias biologicamente ativas capazes de neutralizar os efeitos provocados pelas peçonhas de serpentes. Mors, (1991) realizou um levantamento etnobotânico no qual foram citadas 578 espécies de plantas antiofídicas de mais de 98 famílias, assim como Martz, (1992), que listou 11 espécies de plantas com potencial terapêutico do tratamento de acidentes com serpentes. Moura, (2012) avaliou o potencial antiofídico de 12 espécies de plantas utilizadas por moradores de comunidades tradicionais da região do Eixo Forte e Alter-do-Chão do município de Santarém, Pará, Brasil. Esses estudos apresentam uma variedade de

plantas medicinais com potencial antiofídico que podem ser futuramente utilizadas como droga ou como modelo de formulação de novas drogas.

Muitos outros trabalhos têm demonstraram a eficácia dos mais variados extratos de plantas ou componentes puros e semipuros frente às atividades edematogênica (Costa *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2011), miotóxica (Cavalcante *et al.*, 2007; Collaço *et al.*, 2012) hemorrágica (Borges *et al.*, 2005; 2001), neurotóxica e coagulante, usando tanto a peçonha bruta, como enzimas isoladas (Izidoro *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2005) de peçonhas de várias espécies de serpentes peçonhentas, principalmente as serpentes do gênero *Bothrops*.

Em trabalho realizado por Strauch *et al.* (2013), foi comprovado a eficiência do extrato etanólico e de três terpenos (lupeol, sitosterol, acenol) isolados de *Humirianthera ampla* Miers (Icacinaceae) em inibir as atividades miotóxica, hemorrágica, proteolítica e edematogênica quando pré incubados com a peçonha das serpentes *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu*. Mendes *et al.* (2013) avaliaram o triacontilo p-coumarato, um composto ativo obtido do extrato hexânico da raiz de *Bombacopsis glabra* capaz de inibir ação hemorrágica, miotóxica e fibrinogenolítica da peçonha bruta de *Bothropoides pauloensi*, bem como das enzimas metaloproteinase e fosfolipase A₂ isoladas. Ximenex *et al.* (2012) demonstraram o potencial antiófidico da harpalycin obtida do extrato etanólico de *Harpalyce brasiliiana* Benth. (Fabaceae), indicando a capacidade desse composto em inibir a atividade enzimática da fosfolipase A₂ (PrTX-III) isolada da peçonha de *Bothrops pirajai* e ainda sugerindo o possível mecanismo de interação entre a harpalycin e a enzima isolada PrTX-III. Entre os metabólitos secundários, os compostos fenólicos se destacam pela atividade antiofídica que apresentam. Dentre eles podemos destacar os taninos isolados de *Mimosa pudica* L. (Fabaceae) (Ambikabothly *et al.*, 2011; Sai *et al.*, 2011) e o ácido rosmarinico isolados *Cordia verbenácea* e de *Argusia argentea* (Ticli *et al.*, 2005 ; Aung *et al.*, 2010).

A busca por novos compostos capazes de ajudar diretamente no tratamento do envenenamento, ou indiretamente, como suplementos para soroterapia convencional é de suma importância (Soares *et al.*, 2003), principalmente porque um grande número de trabalhos mencionam a capacidade de extratos de plantas em inibir a ação da peçonha de serpentes, mas poucos identificam os constituintes químicos dos extratos e seu mecanismo de ação (Mors *et al.*, 2000). Assim, é inquestionável que as plantas medicinais representam não só uma importante fonte para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas, como também uma alternativa terapêutica no tratamento de diversas enfermidades, inclusive envenenamento por serpentes (Oliveira *et al.*, 2012).

1.1.7 *Plathymenia reticulata* Benth.

A *Plathymenia reticulata*, uma árvore da família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, primeiramente foi descrita por Bentham (1842), que reconheceu duas espécies para o gênero: *Plathymenia reticulata* Benth. e *Plathymenia foliosa* Benth. Contudo, a partir de estudos realizados por Lewis e Warwick (2003) as duas espécies passaram a serem consideradas sinônimos, assim, *Plathymenia reticulata* tornou-se a única espécie catalogada do gênero *Plathymenia*.

A planta é conhecida popularmente por vinhático (Lorenzi, 2002), um nome que remete para o “vinho tinto” devido à cor do tronco da árvore (Silva Júnior, 2005). *P. reticulata* é uma árvore com cerca de 10m de altura, com tronco de casca grossa, sulcada, de cor castanho-avermelhada, as folhas são alternas, compostas por 5 a 8 pares de folíolos sendo cada um deles, por sua vez formados por 8 a 15 pares de foliólulos (Figura 04) (Carvalho, 2008). Comumente encontrada em ecossistemas de savana (Almeida *et al.*, 1998) tem ocorrência no Brasil, Bolívia, Paraguai e Suriname (Lewis & Warwick, 2003). No Brasil a distribuição de *P. reticulata* ocorre em pelo menos 14 Estados. Na região Norte do país é encontrado somente no estado do Pará (Figura 05) (Morim, 2014).

É uma árvore de grande valor econômico devido à alta qualidade da sua madeira e frequente utilização na recuperação de áreas degradadas. Em 1994 foi classificada pelo Instituto Brasileiro de Pesquisas Agropecuárias – EMBRAPA como uma das espécies vegetais mais importantes do Cerrado (Almeida *et al.*, 1998). Além disso, tornou-se uma espécie de crescente interesse medicinal por apresentar potencial terapêutico no tratamento de algumas doenças inflamatórias, infecções e hemorragias (Pott & Pott, 1994). A casca de *P. reticulata* é bastante comercializada em feiras e mercados e sua utilização geralmente é prescrita na forma de tintura ou chá (Moura, 2012).

Extratos obtidos das cascas de *P. reticulata* mostraram atividade antimicrobiana *in vitro* para vários grupos de microrganismos (Fernades *et al.*, 2005; Toledo *et al.*, 2011) e extratos diclorometano e aquoso da casca apresentaram propriedades antiofídicas, com potencial de inibição para as atividades miotóxica, edematogêncica, hemorrágica, fosfolipásica e coagulante da peçonha bruta das serpentes, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops atrox* (Farrapo *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2013).

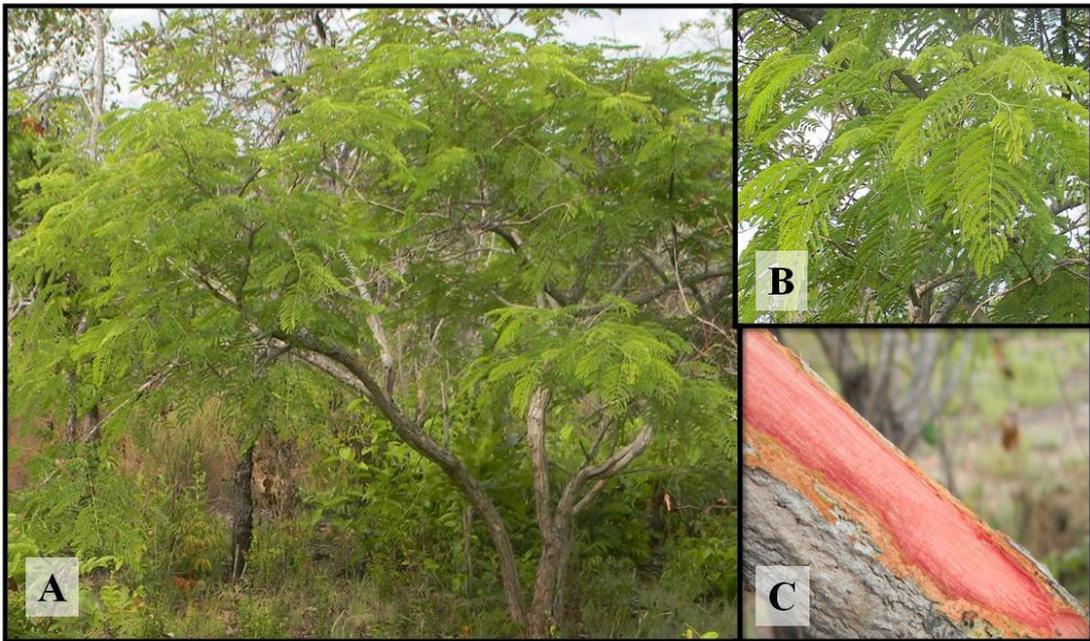


Figura 04: Aspectos gerais de *Plathymenia reticulata* Benth. A) Árvore; B) Folhas; C) Casca; Fotos: Wania Rodrigues.

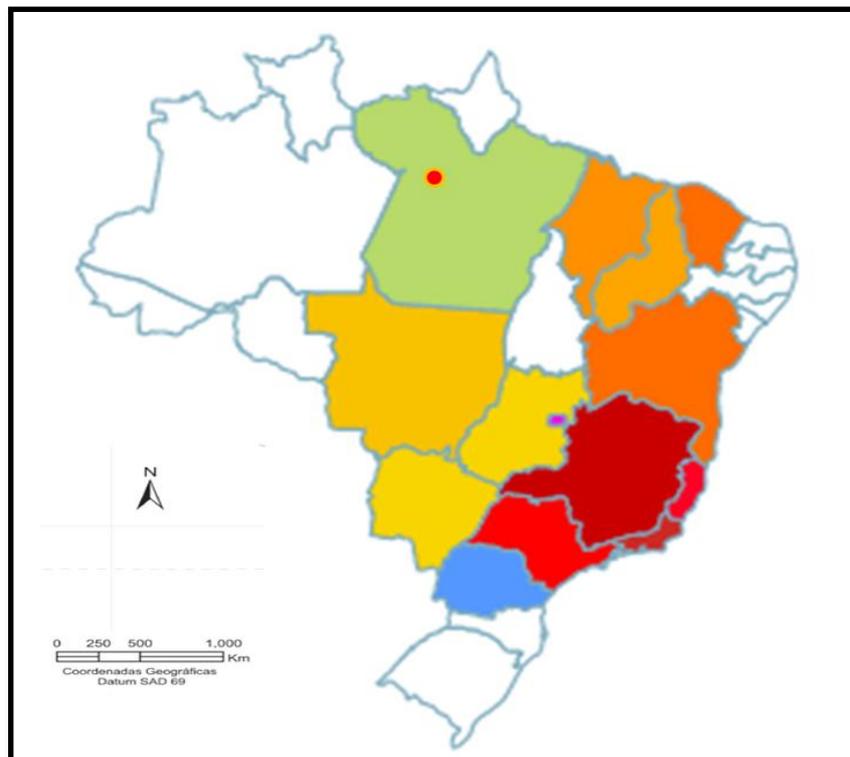


Figura 05: Mapa com locais de ocorrência natural da *Plathymenia reticulata* no Brasil. ● Santarém, Pará
Imagem: Morim, 2014.

A composição química da espécie avaliada em cascas e madeira indica que seu conteúdo químico é constituído por flavonoides (Fernandes *et al.*, 2005), terpenos (Leal *et al.*, 2003) taninos e ácidos fenólicos (Farrapo *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2013). Farrapo *et al.* (2011) sugerem que as atividades antiofídicas da *P. reticulata* estão diretamente ligada aos teores de taninos presentes nos seus extratos. Esses taninos podem estar agindo por meio de ligações com as proteínas da peçonha, ou atuando como quelante de íons metálicos como cálcio e zinco presentes na estrutura das toxinas da peçonha botrópica, inibindo sua atividade enzimática (Mendes *et al.*, 2013).

P. reticulata é abundante nas regiões de savana do município de Santarém, Pará, Brasil, e muito utilizada pela população local para tratar vítimas de acidentes ofídicos (Moura, 2012). Embora alguns trabalhos tenham descrito a ação antiofídica de seus extratos (Farrapo *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2013), até o momento nenhum composto com ação antiofídica foi isolado da planta.

1.1.8 Taninos

Os taninos são compostos do metabolismo secundário das plantas e que já foram identificados como princípios ativos de vários extratos vegetais pesquisados pela farmacognosia mundial (Castejon, 2014), por serem compostos fenólicos, são altamente reativos quimicamente e podem formar pontes de hidrogênio intra e intermoleculares (Monteiro *et al.*, 2005).

A definição fitoquímica de tanino foi proposta por Bate-Smith *et al.* (1962), que os definiu como compostos fenólicos solúveis em água, com peso molecular entre 500 e 3000 daltons, com propriedade de formarem complexos insolúveis com os alcaloides, gelatina e proteínas. Porém, essa definição não inclui todos os taninos, pois em estudos mais recentes já se encontram moléculas com massa molar de até 20.000 daltons. Com isso, Khanbabae & Ree (2001), sugerem que os taninos devam ser classificados com base na sua estrutura molecular. Quimicamente os taninos são distribuídos em dois grupos, condensados e hidrolisáveis, embora ambos possam sofrer hidrólise, a diferença está nas subunidades que os compõe (Monteiro *et al.*, 2005).

Os Taninos hidrolisáveis (figura 06) são formados a partir da via do Chiquimato (Monteiro *et al.*, 2005) e sua característica principal é a presença de um poliol central, geralmente D- glicose, e uma parte fenólica formada por ácido gálico. Essa classe de tanino esta dividida em galotaninos e elagitaninos. Os galotaninos são aqueles que na hidrólise

liberam apenas ácido gálico, já os elagitaninos possuem na sua parte fenólica o ácido hexahidroxiidifênico, que após a hidrólise origina ácido elágico (Santos & Mello, 1999).

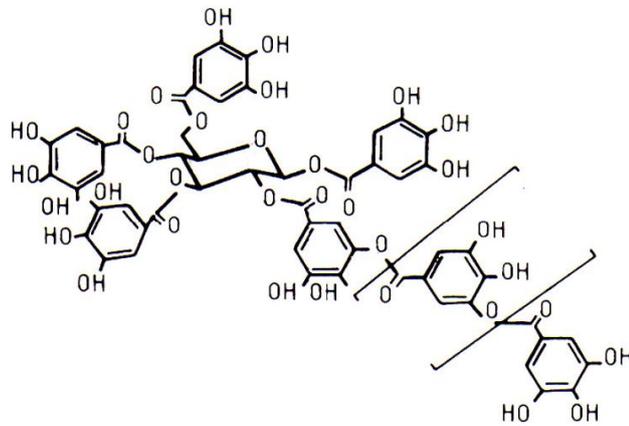


Figura 06: Modelo de estrutura dos taninos hidrolisáveis. Tanino Galico. Imagem: Caetano, 2014

Os taninos condensados (figura 07) são polímeros constituídos por unidades de flavan-3-ol, que quando aquecidos em meio ácido originam antocianidinas, e por isso também são conhecidos por proantocianidinas (Khanbabaee & Ree, 2011). São produtos do metabolismo do Fenilpropanol (Schfield *et al.*, 2001) e apresentam uma rica diversidade estrutural (Monteiro *et al.*, 2005). As unidades fundamentais dos taninos condensados estão geralmente ligadas entre si por ligações do tipo C-C entre o C4 de um flavanol e o C8 ou C6 do flavanol seguinte. O grau de polimerização é bastante variável, podendo-se encontrar oligômeros e polímeros, com moléculas que podem atingir elevados graus de polimerização (Carvalho, 2007).

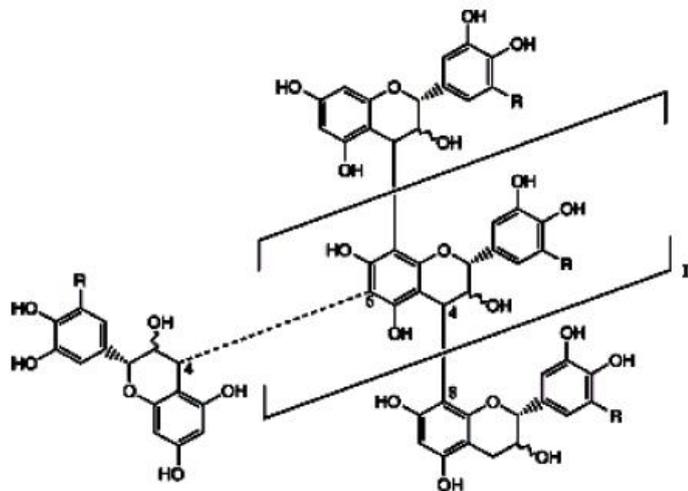


Figura 07: Modelo de estrutura do tanino condensado (Carneiro *et al.*, 2009).

A propriedade dos taninos de formarem complexos com proteínas são fundamentais para explicar o seu papel na proteção vegetal contra patógenos e na detenção de predadores que se alimentam destas plantas (Rocha *et al.*, 2011). Uma vez que essa capacidade de precipitar proteínas, especialmente as proteínas salivares da cavidade oral, caracteriza o sabor adstringente dos taninos (Madhan *et al.*, 2005). Além disso, são compostos facilmente oxidáveis, tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (Monteiro *et al.*, 2005).

Além de serem substâncias que estão diretamente envolvidas na adequação da planta em seu meio, os taninos também apresentam atividades biológicas, tais como: atividades antioxidantes, gastroprotetora, anti-inflamatórias, antialérgicas, anti-hipertensiva e antimicrobiana (Romani *et al.*, 2006). Na medicina popular, plantas ricas em taninos são empregadas no tratamento de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais e processos inflamatórios (Haslan, 1996), além disso, os taninos podem apresentar atividade anticarcinogênica (Chung *et al.*, 1998), e ainda atuar como inibidores de transcriptase reversa em HIV e como captadores de radicais livres (Monteiro *et al.*, 2005).

Extratos ricos em taninos e até mesmo taninos purificados, já foram descritos na literatura como potentes inibidores de peçonhas de serpentes (Borges *et al.*, 2005; Farrapo *et al.*, 2011; Ambikabothly *et al.*, 2011, Sia *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2013). Essa ação de inibição pode ser devido à capacidade que os taninos têm de se ligarem a metais e de precipitar proteínas. Assim, podem atuar como quelante dos íons cálcio e o zinco presentes nas enzimas, ou até mesmo formar complexos com essas proteínas das peçonhas (Mendes *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar o potencial antiofídico de taninos condensados obtidos a partir da casca de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae).

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Obter perfil cromatográfico via Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do extrato aquoso *P. reticulata* para direcionar o isolamento dos seus constituintes;
- ✓ Purificar os taninos condensados presentes no extrato aquoso de *P. reticulata* utilizando cromatografia em coluna;
- ✓ Avaliar a capacidade de taninos condensados purificados do extrato de *P. reticulata* em inibir a ação da peçonha de *Bothrops atrox* quanto às atividades: hemorrágica, edematogênica, fosfolipásica (PLA₂) e coagulante;

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, H.N.; COSTA, T.B.G.; CAVALCANTI, M.L.F. Estudo dos Acidentes Ofídicos Provocados por Serpentes do Gênero *Bothrops* Notificados no Estado da Paraíba. Revista De Biologia e Ciências Da Terra, v.5, 2004.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: Espécies Vegetais Úteis. Planaltina, **EMBRAPA-CPAC**, p.456, 1998.
- AMBIKABOTHY J.; IBRAHIM H.; AMBU S.; CHAKRAVARTHI S., KHALIJAH AWANG K.; VEJAYAN J. Efficacy evaluations of *Mimosa pudica* tannin isolate (MPT) for its anti-ophidian Properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p. 257– 262, 2001.
- ASSAFIM, M.; CORIOLANO, E.C.; BENEDITO, S.E.; FERNANDES, C.P.; LOBO J.F.R.; SANCHEZ, E.F.; ROCHA, L.M.; FULY, A.L., *Hypericum brasiliense* plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of Venom Research**, v.2, p.11-16, 2011.
- AUNG , H.T.; NIKAI, T.; NIWA, M.; TAKAYA, Y., Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage. **Journal of Natural Medicines**, v.64, p. 482-486, 2010.
- BATE-SMITH, E.C.; SWAIN, T., Comparative Biochemistry. New York, **Academic Press**. 1962.
- BERNARDE, P.C. Acidentes ofídicos. Disponível em: <http://www.herpetofauna.com.br/AcidentesOfidicos.htm> Acesso em: 16/10/13.
- BORGES, M.H; SOARES, A.M; RODRIGUES, V.M; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A.M; RUCAVALO, A; GIGLIO, J.R; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of protease from *bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v.39, p.1863-1869, 2001.
- BORGES, M.H; ALVES, D.L.F; RASLAN, D.S; PILÓ-VELOSO, D; A.M; RODRIGUES; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I; DE-LIMA, M.E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p. 21-29, 2005.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. **Fundação Nacional de Saúde**. Brasília-DF, 1999.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Diagnósticos e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília: MS/FUNASA, 2001.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por Animais Peçonhentos: Guia de Vigilância Epidemiológico. Brasília: Secretaria Vigilância em Saúde. Disponível em: http://portalvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3463ca004745920f9a61de3fbc4c6735/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em:10/02/2014.
- BRAZIL, O.V.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H; MÁLAQUE, M.S.E HADDAD J.R. Prefácio. In: Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Sarvier**, São Paulo p.468, 2003.

CAETANO, N.N., Taninos: Aula de farmacognosia. Disponível em: file:///C:/Users/Documents/TANINOS.htm. Acesso em: 14/02/2014.

CALIXTO, J. B., Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

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

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Cornell University Press: Ithaca, New York, 2004.

CARNEIRO, A.C.O, VITAL, B.R.; FREDERICO, P.G.U.; CARVALHO, A.M.L. E GRAZIELA VIDAURRE, G.B., Propriedades de chapas de aglomerado fabricadas com adesivo tânico de angico-vermelho (*anadenanthera peregrina*) e uréia-formaldeído. **Revista Árvore**, v.33 (3) p.521-531, 2009

CARRASCO, P.A.; MATTONI, C.I; LEYNAUD, G.C; SCROCCHI, G.J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American *Bothropoid pitvipers* (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v.41, 109–124, 2012.

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: Ed. Sarvier, p.419-431, 2009.

CARVALHO, E.B. Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos. Tese de Doutorado, Departamento de química. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2007.

CARVALHO, P.E.R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; **Colombo**: Embrapa Florestas, v.3, 2008.

CASTEJON, F.V., Taninos e Saponinas. Disponível em: <http://portais.ufg.br/>. Acesso em: 06/03/2014.

CAVALCANTE, W.L.G; CAMPOS, T.O; PAI-SILVA, M.D; PEREIRA, P.S; OLIVEIRA, C.Z; SOARES, A.M; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 490-497, 2007.

CHUNG, K.T; LU, Z; CHOU, M.W. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. **Food and Chemical Toxicology**. v. 36, p. 1053-1060, 1998.

COLLAÇO R. C. O.; COGO J.C; RODRIGUES-SIMIONI L.; T ROCHA T.; YOKO OSHIMA-FRANCO Y.; RANDAZZO-MOURA P. Protection by *Mikania laevigata* (guaco)

extract against the toxicity of *Philodryas olfersii* snake venom. **Toxicon**, v.60, p.614-622, 2012.

COSTA, H.N.R.; SANTOS, M.C.; 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, p. 744-750, 2008.

COUTINHO, D.F., AGRA M.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroidae). *Rev Bras de Farmacogn.* 2006; 16:(2):178-84.

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 apresentado ao programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo. 2010.

DE PAULA, R.C.; SANCHEZ, E.F.; COSTA, T.R.; MARTINS, C.H.G.; PEREIRA, O.S.; LOURENÇO, M.V.; SOARES, A.M.; FULY, A. Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.16, p.311-326, 2010.

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

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

ESTRADA, G.S.; JIMÉNEZ, S.L.; ALARCON, P.J.C.; VARGAS, L.J., Application of ultrasound in the dissolution of potential antiophidian compounds from two ethanolic extracts of two species of Heliconias. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 756-759, 2010.

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.

FERNANDES, A.T.; SANTOS, A.T.F.; PIMENTA, F.C. Atividade Antimicrobiana das plantas: *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril*, e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**, v.34 (2), p.113-122, 2005.

FERNANDES, R.S.; COSTA, T.R, MARCUSSI, S.; BERNARDES, C.P.; MENALDO, D.L. GONZALÉZ, R.; 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(1), p. 85-93, 2011.

- FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, M.S., Acidente Botrópico in: Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Sarvier**, São Paulo, p.82, 2009.
- FRANÇA, F.G.R.; MESQUITA, D.O.; COLLI, G.R., A checklist of snakes from Amazonian savannas in Brazil, housed. In: coleção Herpetologia da Universidade de Brasília. **Occasional Papers Sam Noble Oklahoma, Museum of Natural History**, v.17, p.1-13, 2006.
- FRANCO, F.L. Origem e diversidade das serpentes. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Savvier**, São Paulo-SP, p. 22, 2009.
- FURTADO, M.F.D.; COLLETO, G.M.D.D.; DA SILVA, W.D. Controle de qualidade dos peçonhas animais e dos correspondentes anti-peçonhas. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos peçonhas de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizada. **Memórias do Instituto Butantan**. v.53(2), p.149-159, 1991
- GAUS, D.P.; HERRERA, D.F.; TROYA, C.J.; GUEVARA, A.H., Management of Snakebite and Systemic Envenomation in Rural Ecuador Using the 20-minute Whole Blood Clotting Test. **Wilderness & Environmental medicine**, v.24, p. 345- 350 , 2013.
- GUÉRCIO R.A.P; SHEVCHENKO, A; SHEVCHENKO, A; LÓPEZ-LOZANO, J.L.; PABA, J.; SOUSA M.V. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science**, v.4, p.11, 2006.
- GUTIÉRREZ, J.M & LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, p.1405-24, 1995.
- GUTIÉRREZ, 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. Compreendendo los peçonhas de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Revista de Biología Tropical**, v.50, p.377- 394, 2002.
- GUTIÉRREZ, J.M & LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, In RM Kini, Venom Phospholipase A₂ Enzymes. Structure, Function and Mechanism. **Wiley Chichester**, p, 321-352, 1997.
- HASLAM, E., Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**. v. 59, p. 205-215, 1996.
- IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E.V.; AMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie**,v. 85, p. 669 - 675, 2003.
- KHANBABAEE, K.; REE, T.V., Tannins: Classification and definition. **Nature Products Reports**, v. 18, p. 641–649, 2001.
- KARDONG, K. V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids & elapids. **Memorias do Instituto Butantan**, v 46, p.105-118, 1982.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C.; LOBO, S. M. A.; GUIMARÃES, S. M. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni* na região de São José do Rio Preto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p.167-171, 1990.CAMEY 2002

KINI, R. M. Structure-function relationship and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v.45, p.1147-61, 2005.

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

LEAL, R.S.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA,E.R. Cassane Diterpenes from *Plathymania reticulata*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.14, p.120-125, 2003.

LEWIS, G.P.; WARWIRC, M.C. Revision of *Plathymania* (Leguminosae Mimosoideae). **Endinburgh Journal of Botany**, v.60, n.2, p.111-119, 2003.

LU, Q.; CLEMETSON, J.M.; CLEMETSON, K.J. Snake venoms and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.3, p.1791-1799, 2005.

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

MADHAN, B.; SUBRAMANIAN, V.; RAGHAVA RAO, J.; BALACHANDRAN, U.N.; RAMASAMI, T., Stabilization of collagen using plant polyphenol: role of catechin. **Journal of Biological Macromolecules**, v.37, n.1-2, p.47-53, 2005.

MAGALHÃES A.; SANTOS G.B.; VERDAM M.C.S.; FRAPORTI L.; MALHEIRO A.; LIMA E.S.; DOS-SANTOS M.C. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 82-88, 2011.

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

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

MEBS, D. Venomous and poisonous Animals: A handbook for Biologists, Toxicologists Toxinologists, Physicians. **Medpharm Scientific Publishers**, Stuttgart, Germany, 2002.

MELGAREJO. A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clinica e terapêutica dos acidentes. **Sarvier**, São Paulo- SP, p.42 2009.

MENDES, M.M.; VIEIRA, S.A.P.B.; GOMES, M.S.R.; PAULA, V.F.; ALCÂNTARA, T.M., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; DOS SANTOS ,J.I.; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.M.; RODRIGUES, V.M., Triacontyl p-coumarate: An inhibitor of snake venom metalloproteinases. **Phytochemistry**, v.86, p.72–82, 2013.

MOLE, S.; WATERMAN, P.G., A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, Berlin, v. 72, p. 137-147, 1987.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28 (5) p. 892-896, 2005.

MORIM, M.P. *Plathymenia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB83636>>. Acesso em: 28/02/2014.

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.; PEREIRA, N.A., Plant natural products active against snake bite. **Phytochemistry**, v.55, p. 627-642, 2000.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; SERRANO, S.M.T.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ J.M., Snake venom metalloproteinases: Structure, function and effects on snake pathology. In: *Animal Toxins: State of the art. Perspectives in health and biotechnology*. UFMG, Belo Horizonte, p. 525, 2009.

MOURA, V.M. Efeitos De Extratos Vegetais Sobre Atividades Biológicas Induzidas por Peçonhas Botrópicas. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Oeste do Pará. Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, 2012.

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

NISHIJIMA, C.M.; RODRIGUES, C.M.; SILVA, M.A.; FERREIRA, M.L. VILEGAS, W. HIRUMA-LIMA, C.A., Anti-hemorrhagic Activity of Four Brazilian Vegetable Species Against *Bothrops jararaca* venom. **Molecules**, v.14, 1072-1080, 2009.

NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; DE LA TORRE, P.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards a edomorphism. **Journal Proteomics**, v. 73, p.57-78, 2009.

OLIVEIRA, A.P.; RIBEIRO, E.A.N.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, W.; SANTOS, M.R.V. Plantas medicinais da flora brasileira, In: **Farmacognosia coletânea científica**. Ouro Preto, UFOP, p.252, 2012.

PEREIRA, A.Z.P. Proteômica e transcriptômica aplicadas ao estudo da variabilidade da peçonhade *Bothrops jararaca* (serpentes: Viperidae). Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica), Universidade de São Paulo, 2011.

PINHO F.M.O; PEREIRA I.D. Ofidismo. **Regista da Associação Médica Brasileira** v.47(I)24-09, 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.
- ROCHA W.S.; LOPES, R M.; SILVA, D.B.; VIEIRA R.F.; SILVA, J.P.; AGOSTINI-COSTA, T.S. Compostos Fenólicos Totais e Taninos Condensados em Frutas Nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33 (4), p. 1215-1221, 2011.
- ROMANI, A.; IERI, F.; TURCHETTI, B.; MULINACCI N.V.; INCIERI, F.F.; BUZZINI, P., Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 41, v. 415-420, 2006.
- RUSSELL, F.E. Prevention and Treatment of Venomous Animal Injuries. **Experientia**, v.30, p.8-12, 1974.
- SANCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, DT, MR, CORDEIRO, M.N. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v.30, p.95–103, 1992.
- SANO-MARTINS, I.S.; SANTORO, M.L. distúrbios hemostáticos em envenenamento por animais peçonhento. In: Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Sarvier**, São Paulo, p.331, 2009.
- SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B; OLIVEIRA, C.Z; BERNARDES, C.P; MENALDO. D.L; FULY, A.L; ARANTES, E.C; SAMPAIO, S.U; MAMEDE, C.C; BELETTI, M.E; OLIVEIRA, F.; SOARES, A.M. A New Acidic myatotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isoled from *Brothrops moojeni* snak venom. **Toxicon**, v.52, p.30, 908–917, 2008.
- SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, p. 614-656, 1999.
- SCHFIELD, P.; MBUGUA, D.M., PELL, A.N., Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p.21-40.
- SERRANO, S.M.T.; MAROUN, R.C., Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v.45, p.1115-1132, 2005.
- SIA, F.Y.; VEJAYAN, J.; JAMUNA, A.; AMBU, S. Efficacy of tannins from *Mimosa pudica* and tannic acid in neutralizing cobra (*Naja kaouthia*) venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.17(1), p. 42-48, 2011.
- SILVA JÚNIOR, M. C. Cem árvores do Cerrado: guia de campo. Rede de sementes do Cerrado. Brasília, 2005.
- SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanwebr>. Acesso em: 15/01/2014.
- SOARES, A. M.; GIGLIO. J. R.; Chemical modifications of phospholipases A₂ from snakes venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**. v.42. p.255-268, 2003.
- SOUSA, LA.F.; Moura, V.M.; RAPOSO, J.D.A.; SOUSA, L.F. OLIVEIRA, R.B.; SANTOS, L.S ARAÚJO, R.N.M.; MOURA DA SILVA, A.M.; ARANHA, E.P., SUEMITSU, C.;

GUERRA, C.E.; CHALKIDIS, H.M. SILVA, M.N.; PACHECO, S.; MOURÃO, R.H.V., The effect of the aqueous extract of *Myrcia guianensis* (Aubl) DC and its fractions against the hemorrhagic activity of *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7(42), p. 3139-3146. 2013

SOARES, A. M.; GIGLIO. J. R.; Chemical modifications of phospholipases A₂ from snakes venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**. v.42. p.255-268, 2003.

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

TAN, N.H.; FUNG S.Y, SIM, S.M.; MARINELLO, E.; GUERRANTI R. ;AGUIYI, J. C. The protective effect of *Mucuna pruriens* seeds against snake venom poisoning. **Journal of Ethnopharmacology**. v.123, p.356-358, 2009.

TICLI, F.K.; HAGE, L.I.S.; CAMBRAIA, R.S.; PEREIRA, P.S.; MAGRO, A.J. FONTES, M.R.M.; STÁBELI R.G., GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v.46, p.318-327, 2005.

TEIXEIRA, C.F.P.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; ZAMUNER, S.F., Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.100, 2005.

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. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133. p.420- 425, 2011.

WEN, F. H. Soroterapia. In animais peçonhentos do Brasil: Biologia, clinica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**: p.432, 2009.

XIMENES, R.M.; RABELLO, M.M.; ARAÚJO, R.M.; SILVEIRA, E.R.; FAGUNDES, F. H. R.; DIZ-FILHO, E.B.S.; BUZZO, S.C.;SOARES, V.C.G.; TOYAMA, D.O.; GAETA, H.H.; HERNANDES, M.Z.; MONTEIRO, H.S.A.; TOYAMA, M.H., Inhibition of Neurotoxic Secretory Phospholipases A₂ Enzymatic, Edematogenic, and Myotoxic Activities by Harpalycin 2, an isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliiana* Benth. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-9. 2012.

ZYCHAR, B. C.; DALE, C. S.; DEMARCHI, D.; GONÇALVES, L. R. C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon** v.55, p.227-234, 2010.

Capítulo I

Potencial antiofídico de taninos condensados purificados de *Plathymenia reticulata* Benth. Fabaceae *

Wania C.R. da Silva,
Juliana D. A. Raposo,
Valéria Mourão de Moura,
Luciana A.F. de Sousa,
Ricardo Bezerra de Oliveira,
Rosa H.V. Mourão.

*Capítulo escrito de acordo com as normas do periódico Toxicon (ISSN 0041-0101). Após revisão o mesmo será traduzido para língua inglesa e submetido ao periódico.

Potencial antiofídico de taninos condensados purificado de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) *

Wania C.R. da Silva^{ab}, Juliana D. A. Raposo^b, Valéria Mourão de Moura^c, Luciana A.F. de Sousa^{ab}, Ricardo Bezerra de Oliveira^b, Rosa H.V. Mourão^b.

^a Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Pará, rua Vera Paz, s/n, Salé, Santarém. PA, 68035-110, Brasil.

^b Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará, rua Vera Paz, s/n, Salé, Santarém. PA, 68035-110, Brasil.

^c Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6.200, 69077-000, Manaus, AM.

Resumo

Neste trabalho foi avaliado o potencial antiofídico de taninos condensados purificados do extrato aquoso de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) frente às atividades edematogênica, hemorrágica, fosfolipásica e coagulante induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*. A investigação preliminar dos constituintes químicos do extrato aquoso de *P. reticulata* (EAPr) foi realizada por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em seguida, o EAPr foi purificado por cromatografia em coluna utilizando Sephadex LH20, resultando em cinco frações principais (A,B,C,D e E), que posteriormente foram submetidas a ensaios colorimétricos para a avaliação das concentrações de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados. A fração (E) foi definida como taninos condensados de *P. reticulata* (TCPr) e escolhida para a avaliação do potencial antiofídico. O TCPr foi avaliado em diferentes protocolos experimentais *in vivo* e *in vitro*. *In vivo*: (1) pré-incubação, (2) pré-tratamento (v.o.); (3) pós-tratamento (v.o.) frente às atividades hemorrágica e edematogênica induzidas pela peçonha de *B. atrox*. *In vitro*, testado frente às atividades fosfolipásica e coagulante com protocolo de pré-incubação em ambos os testes. A atividade hemorrágica apresentou uma inibição significativa ($p < 0,05$) quando utilizado o protocolo de pré-incubação (55% e 74%) e pré-tratamento (19% e 13%), no entanto, não houve inibição significativa para a concentração testada no grupo pós- tratamento por via oral. O edema induzido pela peçonha de *B.atrox* apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) em todos os protocolos testados. As atividades fosfolipásica e coagulante foram completamente inibidas quando pré-incubadas com a peçonha de *B. atrox* nas concentrações (1:5 e 1:10). Os resultados obtidos indicam que o TCPr pode ser uma boa fonte de inibidores naturais contra os envenenamentos ofídicos.

Palavras-chave: *Plathymenia reticulata*, taninos condensados, acidentes ofídicos.

1. Introdução

O uso de plantas medicinais com propriedades antiofídicas ainda é uma prática muito utilizada tradicionalmente em várias partes do mundo (Ambikabothy *et al.*, 2011) e surge como uma alternativa para os casos de acidentes ofídicos, principalmente onde o acesso à soroterapia convencional é restrito (De Paula *et al.*, 2010). Por ser uma rica fonte de compostos bioativos (Mors *et al.*, 2000), os extratos vegetais possuem propriedades bioquímicas capazes de inibir os efeitos tóxicos do veneno de várias espécies de serpentes (Maiorano *et al.*, 2005), no entanto, o mecanismo de interação entre compostos ativos de plantas e as toxinas e enzimas letais da peçonha é ainda pouco conhecido.

Nos últimos anos, pesquisadores têm comprovado a eficácia de uma variedade de espécies vegetais de diferentes famílias, tais como: *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) (Borges *et al.*, 2001; Cavalcante *et al.*, 2007), *Casearia mariquitensis* Kunth. (Flacourtiaceae) (Izidoro *et al.*, 2003), *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) (Borges *et al.*, 2005), *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) (Maiorano *et al.*, 2005), *Mikania laevigata* Sch.Bip.ex Baker (Asteraceae) (Collaço *et al.*, 2012), *Aristolochia indica* L. (Aristolochiaceae) (Bhattacharjee & Bhattacharyya, 2013), *Mimosa pudica* L. (Fabaceae), *Serjania erecta* Radlk. (Sapindaceae) (Fernandes *et al.*, 2011) (Ambikabothy *et al.*, 2011), *Cordia verbenácea* D.C (Boraginaceae) (Ticli *et al.*, 2005), *Eclipta prostrata* L. (Asteraceae), (Magalhães, *et al.*, 2011).

Plathyenia reticulata Benth (Fabaceae) é conhecida popularmente como vinhático (Lorenzi, 2002), uma árvore característica de ambientes de savana, com ocorrência natural em 14 estados brasileiros, inclusive na região norte do país, onde é encontrada somente no estado do Pará (Morim, 2014). Essa espécie tem sido utilizada tradicionalmente para tratar envenenamentos causados por serpentes em comunidades de Santarém, Pará, Brasil (Moura *et al.*, 2013).

O extrato aquoso da casca de *P. reticulata* inibiu, após pré-incubação, as atividades hemorrágica, coagulante, edematogênica e fosfolipásica induzidas pela peçonha bruta de *Bothrops atrox* (Moura *et al.*, 2013). Farrapo *et al.* (2011), demonstraram que o extrato diclorometano das cascas de *P. reticulata*, foi capaz de reverter o bloqueio neuromuscular e os efeitos miotóxicos induzidos pela peçonha de *Bothrops jararacussu*, provavelmente por precipitação das proteínas da peçonha, devido interação com taninos presente no extrato. No entanto, nenhuma dessas atividades antiofídicas atribuídas a *P. reticulata* foram obtidas utilizando compostos isolados.

A busca por compostos que possam complementar, ou ser uma alternativa a atual soroterapia na inibição dos efeitos locais provocados por peçonhas, aliada a alta incidência de acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops* na região, e ao uso popular de *P. reticulata* para tratar vítimas de acidente com serpentes, motivou o desenvolvimento deste trabalho, cujo objetivo foi avaliar o potencial antiofídico de taninos condensados, purificados de casca de *P. reticulata*, contra os efeitos enzimáticos e biológicos induzidos pela peçonha de *Bothrops atrox*.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta do material vegetal e obtenção do extrato aquoso

Amostra das cascas de *P. reticulata* foram coletadas próximo a comunidade de Cucurunã, Santarém, PA, Brasil (02°26' 53,9" S e 54°47'05" O) em maio de 2012. Exsiccatas da espécie encontram-se depositadas no Herbário Embrapa Amazônia Oriental/Belém sob o código IAN: 185215.

Após limpeza e seleção, as cascas de *P. reticulata* foram desidratadas em estufa com ventilação de ar forçada a 40°C (Licit LC-E80, Revest Arc), posteriormente triturado em moinho de facas, resultando em um material seco e moído, que foi mantido em condições de temperatura ambiente.

O extrato aquoso foi obtido a partir de 50 g do material seco e moído, adicionando-se 250 mL de água destilada. A mistura foi mantida a 70°C ± 5° por 2 horas sob agitação constante a 1250 rpm. Após a extração, o extrato aquoso foi filtrado e liofilizado, obtendo-se 12,9 g de extrato aquoso bruto (EAPr).

2.2 Obtenção do perfil cromatográfico via CCD

O perfil cromatográfico preliminar do extrato aquoso de *P. reticulata*, foi determinado por cromatografia em camada delgada (CCD). Para a realização das análises, 10mg do EAPr foi solubilizado em 1 mL de metanol. Soluções padrões de 1,2-benzopirona, rutina, timol, esculina, catequina e ácido tânico foram empregadas para a detecção de cumarinas, flavonóides, terpenóides taninos condensados e hidrolisáveis no EAPr. O sistema cromatográfico teve como fase estacionária sílica gel 60 F₂₅₄ e fase móvel com misturas de eluentes de diferentes polaridades, com variação nas concentrações dos solventes que foram: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água- 6,75:0,75:0,75:1,75 (v:v:v:v);

butanol, ácido acético e água- 4:1:5 (v:v:v); hexano, acetato de etila e ácido fórmico-8,5:1:0,5 (v:v:v); tolueno: éter etílico 5:5 (v:v) saturada com 10% de ácido acético.

Após a eluição, as cromatoplasmas foram derivatizadas com reagentes específicos visando evidenciar as principais classes de substâncias químicas presentes no EAPr: solução NP PEG (difenilboriloxietilamina/ polietilenoglicol), sub luz UV_{365nm} para a detecção de flavonóides (coloração laranja) e cumarinas glicosídicas (coloração azul fluorescente); solução alcoólica de cloreto férrico 1% (m/v), para detecção de taninos hidrolisáveis (coloração cor azul escuro); solução metanólica de vanilina clorídrica 1% (m/v) para detecção de taninos condensados (coloração vermelha); vanilina sulfúrica 1% (m/v) para a detecção de terpenóides (coloração amarelo-marrom); solução etanólica de KOH 5% (m/v), sub luz UV_{365nm} para detecção de cumarinas agliconas (coloração verde fluorescente).

2.3 Purificação de taninos condensados

O extrato aquoso de *Plathymania reticulata* foi purificado por gel filtração utilizando gel de Sephadex LH20 de acordo com método descrito por Young e Paterson, (1979), com modificações. O cromatógrafo líquido AkTA Explorer 10S (GE Healthcare) com detector UV-vis e software Unicorn foram utilizados como ferramenta na otimização da pressão, taxa de fluxo e o tempo da análise. A coluna (14,4 x 2,5 cm) foi preenchida como gel Sephadex LH20 (GE Healthcare) previamente preparada em solução metanol:água 50% (v/v). Os parâmetros para a eluição cromatográfica foram: fluxo 2mL/min, detecção UV nos comprimentos de onda em 280 e 320 nm.

Para injeção da amostra, o extrato aquoso (0,15g) foi diluído em 1mL de solução de metanol 50% e filtrado em membrana de ester celulose (0,45 µm). A amostra foi eluída em sistema isocrático metanol:água 50% (126mL), seguido por sistema gradiente segmentado de acetona:água nas seguintes concentrações: 20% (36mL), 30 % (36 mL), 40% (36mL), 50 % (36mL), 60% (36 mL), 70% (132 mL) (v/v), os volumes de solventes utilizados foram escolhidos de acordo com o volume da coluna. O fracionamento cromatográfico resultou em 7 frações, que foram monitoradas por CCD, com sistema de eluição e reveladores próprios para a detecção de taninos.

A partir do perfil cromatográfico por CCD, as frações foram reunidas resultando em cinco frações principais: **A** (metanol 50%), **B** (acetona 20% e 30%), **C** (acetona 40% e 50%), **D**(acetona 60%), **E** (acetona 70%). Em todas as frações, os solventes metanol e a acetona foram removidos sob pressão reduzida (rota evaporação a 40°C). Em seguida, as frações foram liofilizadas.e submetidas a biomonitoramento, (testadas contra a atividade fosfalipásica

do veneno de *B. atrox*). A fração **E** apresentou maior inibição da atividade fosfolipásica, em virtude disso, foi escolhida para a continuidade dos ensaios farmacológicos e definida como taninos condensados de *Plathymenia reticulata* (TCPr).

2.4 Ensaios colorimétricos do extrato e frações

O EAPr e frações (A, B, C, D e E) de *P. reticulata* foram analisados por ensaios colorimétricos para quantificação de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados.

A determinação de fenóis totais presente nas amostras foi realizada segundo metodologia de Hagerman e Butler, descrito por Mole e Waterman, (1987). Este método se baseia na reação de complexação dos compostos fenólicos presentes nas amostras com o cloreto férrico (Vetec) produzindo um complexo colorido. Nas amostras diluídas em água (1 mg/mL) foi adicionado solução de cloreto férrico (1,62 g de cloreto férrico em 1L de solução 0,001 M de HCl) em meio alcalino contendo 1% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (Vetec) e 5% (m/v) de trietanolamina (Sigma). As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro de UV/visível (Quimis, Q-108U2VL) no comprimento de onda de 510 nm. A curva padrão foi feita com ácido tânico (Sigma) nas diluições 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 e 0,8 mg/mL. O coeficiente de correlação da curva foi de $R = 0,9999$ e os resultados foram expressos em ácido tânico (g por 100 g de extrato/fração).

A determinação de taninos totais foi realizada de acordo com o método de Hagerman e Butler, descrito por Mole e Waterman, (1987) por precipitação de proteína. Estes compostos foram quantificados nas amostras pela formação do complexo tanino-albumina sérica bovina (BSA, Sigma). Neste ensaio as amostras diluídas em água (1,0 mg/mL) foram precipitadas com solução de albumina sérica bovina (1,0 mg/mL) em tampão de acetato de sódio (pH 4,9) e centrifugadas (Sigma 3-18K,) a 3000 rpm por 15 minutos para separação de taninos dos outros fenóis. Após dissolução do precipitado na solução de dodecil sulfato de sódio/Trietanolamina foi adicionado solução de cloreto férrico, que produz um complexo colorido o qual foi medido a 510 nm. A curva padrão foi feita com ácido tânico nas diluições 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 e 0,8 mg/mL. O coeficiente de correlação foi de $R = 0,9994$ e os resultados foram expressos em ácido tânico (g por 100 g de extrato/fração).

Para a determinação de taninos condensados, foi utilizado o método da reação da vanilina em meio ácido conforme descrito por Sun *et al.* (1998) com modificações. Nas amostras diluídas em metanol (0,5 mg/L) foram adicionadas solução de vanilina 1% (m/v) / H_2SO_4 5% (v/v) em metanol (Tedia) previamente preparada. A reação foi mantida em banho-maria a 30 °C por 15 minutos para formação de compostos avermelhados que foram medidos

no comprimento de onda de 500 nm. A curva padrão foi feita com catequina hidratada (Sigma) nas diluições 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL. O coeficiente de correlação foi de $R= 0,9993$ e os resultados foram expressos em catequina (g por 100 g de extrato/fração).

Para eliminar interferências colorimétricas nos ensaios, foram preparadas soluções branco conforme as amostras, porém sem adição dos reagentes cromogênicos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5 Animais e peçonha

Os animais utilizados nos experimentos *in vivo* foram camundongos Swiss (*Mus musculus*), com idade aproximada de dois meses pesando entre 20 e 39 g, mantidos em condições padrões de biotério com temperatura 22 ± 1 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, acondicionados em gaiola de polipropileno padrões, com água e ração *ad libitum*. A peçonha bruta de *Bothrops atrox* foi cedida pelo Laboratório de Pesquisas Zoológicas – LPZ da Faculdade Integradas do Tapajós - FIT, Santarém, PA, a peçonha foi liofilizada e a concentração de proteína determinada pelo método de Bradford (1976). Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes da Lei Federal 11.794 e com aprovação de Comitê de Ética da Universidade do Estado do Pará- UEPA sob o protocolo de número 43/11.

2.6 Potencial antiofídico *in vitro* e *in vivo* de taninos condensados de *Plathymania reticulata* (TCPPr)

2.6.1 Atividade edematogênica

A atividade edematogênica da peçonha de *Bothrops atrox* foi realizada de acordo com o método descrito por Yamakawa *et al.* (1976). Para a indução do edema foi realizada injeção intramuscular na pata traseira de camundongos de 10 µg (duas vezes a Dose Mínima Edematogênica-DME) de peçonha bruta de *B. atrox* diluída em 50 µL de salina. Para avaliar o efeito bloqueador TCPPr frente a atividade edematogênica da peçonha de *B. atrox*, foram utilizados dois protocolos de tratamento: 1) **Pré-tratamento**: administração por via oral de TCPPr (50 e 100 mg/Kg) 15 minutos antes da injeção da peçonha; 2) **Pós-tratamento**: administração via oral de TCPPr (100mg/Kg) imediatamente após a injeção da peçonha. O grupo utilizado como controle recebeu apenas água destilada por via oral. O volume da pata foi medido com pletismômetro digital (EEF 304, Plethysmometer, Insight), imediatamente após a injeção da peçonha (tempo zero) e nos tempos de 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. O

edema foi expresso em mL pela diferença entre o volume da pata no tempo zero e nos demais tempos.

2.6.2. Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica de TCPr frente a peçonha de *B. atrox* foi avaliada de acordo com o método descrito por Kondo *et al.* (1960) com modificações. Para a indução da hemorragia foi realizada injeção intradérmica de 10µg (duas vezes Dose Mínima Hemorrágica-DME) de peçonha de *B. atrox* diluída em 50 µL de salina na região dorsal de camundongos. O efeito bloqueador de TCPr frente atividade hemorrágica da peçonha de *B. atrox* foi avaliado utilizando três protocolos de tratamento: 1) **Pré-tratamento**: administração por via oral de TCPr (50 e 100 mg/Kg) 15 minutos antes da injeção da peçonha; 2) **Pós-tratamento**: administração via oral de TCPr (100mg/Kg) imediatamente após a injeção da peçonha; 3) **Pré-incubação**: 10 µg da peçonha de *B. atrox* foi pré-incubado com TCPr por 30 minutos a 37° C , nas concentrações (1:5 e 1:10) (m:m). O grupo controle recebeu água destilada por via oral. Uma hora após a injeção da peçonha, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os tecidos dorsais removidos. A mensuração do halo hemorrágico foi realizada com o auxílio de ferramentas de morfologia matemática (Dougherty, 2002) para a determinação da área do halo hemorrágico em mm. A imagem foi digitalizada e salva no formato RGB. Um Script Matlab (Gonzalez *et al.*, 2009) foi utilizado 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 seguir um operador de Limiarização (Guerra *et al.*, 2011) foi aplicado sobre a componente escolhida de forma a localizar e isolar os pixels que caracterizam o halo hemorrágico. 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 (formato RGB) de forma a destacar o halo. A área e o diâmetro são obtidos da imagem binária, por meio de contagem de pixels e do cálculo de distâncias (Dougherty e Lotufo, 2003).

2.5.3 Atividade fosfolipásica (PLA₂s)

A ação inibitória TCPr sobre a atividade fosfolipásica foi avaliada pela atividade hemolítica indireta em gel de agarose, utilizando gema de ovo e eritrócitos como substrato (Gutiérrez *et al.*, 1988). Amostras contendo TCPr foram pré-incubadas com 2,5µg (duas vezes a Dose Mínima Hemolítica indireta-DMHi) de peçonha de *B. atrox* nas concentrações (1:1,

1:5, 1:10) por 30 minutos a 37°C. Como controle foi utilizado 2,5µg de peçonha de *B. atrox* diluído em salina. A avaliação da atividade hemolítica foi realizada por meio da mensuração do halo de hemólise. A ausência do halo corresponde a 100% de inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *B. atrox*.

2.6.4 Atividade Coagulante

A atividade coagulante da peçonha de *B. atrox* foi realizada de acordo com método descrito por Assakura *et al.* (1992). O efeito bloqueador de TCPr sobre a atividade coagulante da peçonha de *B. atrox*, foi avaliado incubando-o previamente com 4,5 µg da peçonha (Dose Mínima Coagulante-DMC) por 30 minutos por 37°C, nas concentrações (1:1, 1:5, 1:10) (m:m) como controle foi utilizado 4,5µg de peçonha de *B. atrox* diluído em salina. Em seguida, alíquotas foram adicionadas a 100 µL de plasma humano, mantido em temperatura constante de 37°C. O tempo necessário para a formação da rede de fibrina na forma de coágulo foi observado visualmente e mensurado em segundos. A ausência da rede de fibrina depois de decorrido um tempo 120 segundos foi considerado como 100% de inibição.

2.6 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. As médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA), One-Way, seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Perfil fitoquímico do extrato aquoso de *P. reticulata* (EAPr)

O perfil fitoquímico via Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do EAPr frente aos padrões comerciais: timol (fig. 1A), rutina (fig. 1B), esculina (fig. 1C), 1,2-benzopirona (fig. 1D), catequina (fig. 1E) e ácido gálico (fig. 1E), estão apresentados na fig. 1. A presença de manchas avermelhadas após revelação com vanilina clorídrica (fig. E) e manchas azuis após revelação com cloreto férrico (fig. F), sugere a presença de derivados fenólicos, supostamente do grupo dos taninos. Embora ainda não conclusivo, é possível inferir que o EAPr possui alta predominância de taninos condensados.

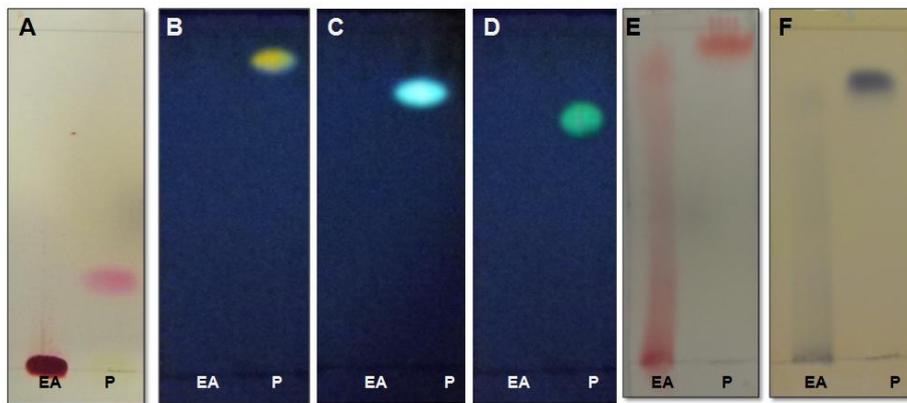


Fig. 1: Cromatografia em camada delgada EAPr. A) revelador: Vanilina sulfúrica, padrão: Timol; B) revelador: NP PEG, UV_{254nm}, padrão: Rutina. C) revelador: KOH, UV_{254nm}; padrão: Esculina. D) revelador: KOH, UV_{254nm}, padrão: 1,2 benzopirona. E) revelador: Vanilina Clorídrica; padrão: catequina. F) revelador: Cloruro férrico; padrão: ácido gálico.

3.2 Purificação de taninos condensados

O sistema metanol e água 50% utilizado no processo de purificação de taninos teve como finalidade remover compostos fenólicos de baixo peso molecular da amostra. Durante a etapa de eluição, os taninos foram observados como uma banda marrom no topo da coluna. A separação dos taninos se mostrou mais eficiente quando o gradiente de acetona e água (20% - 70%) foi utilizado. Desta forma, os taninos foram eluídos gradativamente, sendo observado picos com maiores absorvâncias a partir da eluição em acetona 60%. Ao final do processo de fracionamento foram obtidas sete frações, as quais foram monitoradas por CCD para detecção de taninos condensados. Estes foram observados em todas as frações, exceto na fração metanol 50%. As frações 60% acetona e 70% acetona, quando submetidos à CCD, tiveram forte interação com a sílica e após revelação com vanilina clorídrica apresentaram coloração avermelhada acentuada, indicando alto conteúdo de taninos condensados. Com base no perfil fitoquímico obtido, as frações 20% e 30%, foram reunidas, assim como as frações 40% e

50%, obtendo ao final cinco frações principais (A, B, C, D e E) cujos rendimentos estão expressos na tabela 1, havendo, portanto, recuperação total de aproximadamente 77,5% da amostra aplicada na coluna.

Tabela 1: Rendimento das frações eluídas da coluna com metanol e com gradiente de acetona.

	Fração A	Fração B	Fração C	Fração D	Fração E
Peso(g)	0,53	0,20	0,20	0,38	1,8
Rendimento(%)	13	5	5	9,5	45

Rendimento (%) em relação ao EAPr, Fração A= Metanol 50%; Fração B= Acetona 20 e 30%; Fração C= Acetona 40 e 50%; Fração D= Acetona 60%; Fração E= Acetona 70%.

3.3 Ensaio colorimétricos

As concentrações de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados no EAPr e frações estão expressos na tabela 2. Os resultados mostram um alto conteúdo fenólico tanto no EAPr, quanto nas frações C, D e E, sendo os taninos o grupo predominante. A fração A eluída com metanol 50% apresenta baixa concentração de fenóis totais e ausência de taninos. Por outro lado, a fração E apresenta predominância de taninos em sua composição. Esse resultado foi confirmado após o ensaio com a vanilina sulfúrica, evidenciando que a fração E é rica em taninos condensados e por isso foi definida nesse trabalho como TCPr.

Tabela 2: Ensaio colorimétricos: fenóis totais, taninos totais e taninos condensados do EAPr e frações obtidas de cascas de *P. reticulata*

Amostra	Fenóis totais	Taninos totais	Taninos condensados
EAPr	41,49 ± 2,16	32,75 ± 1,62	68,79 ± 0,49
Fração A	3,86 ± 0,10	-	-
Fração B	25,31 ± 0,11	17,15 ± 0,16	19,08 ± 0,64
Fração C	40,85 ± 1,54	22,10 ± 0,92	83,58 ± 7,06
Fração D	42,38 ± 2,25	36,00 ± 0,67	92,68 ± 3,10
Fração E(TCPr)	48,46 ± 1,77	44,02 ± 0,30	100,00 ± 8,95

Resultados expressos em g por 100g de extrato/fração, em base de peso seco. Fração A= Metanol 50%; Fração B= Acetona 20 e 30%; Fração C=Acetona 40 e 50%; Fração D=Acetona 60%; Fração E=Acetona 70%. (n=3/amostra).

3.4 Inibição da atividade edematogênica

A fig. 2 mostra a evolução do edema após a administração de 10 µg (2DMH) da peçonha de *B. atrox* nos diferentes grupos. O grupo que recebeu 100 mg/kg (v.o.) de TCPPr (pré-tratamento) apresentou redução significativa ($p<0,05$) do edema quando comparado ao grupo controle, com redução máxima de 95%, a partir de 30 minutos da injeção da peçonha. Porém, os animais que receberam 50 mg/kg v.o. (pré tratamento) ou 100 mg/kg v.o. (pós-tratamento) somente apresentaram redução significativa ($p<0,05$) do edema a partir de 60 minutos, com redução máxima de 79% e 77% no tempo de 150 minutos, respectivamente, após a injeção da peçonha.

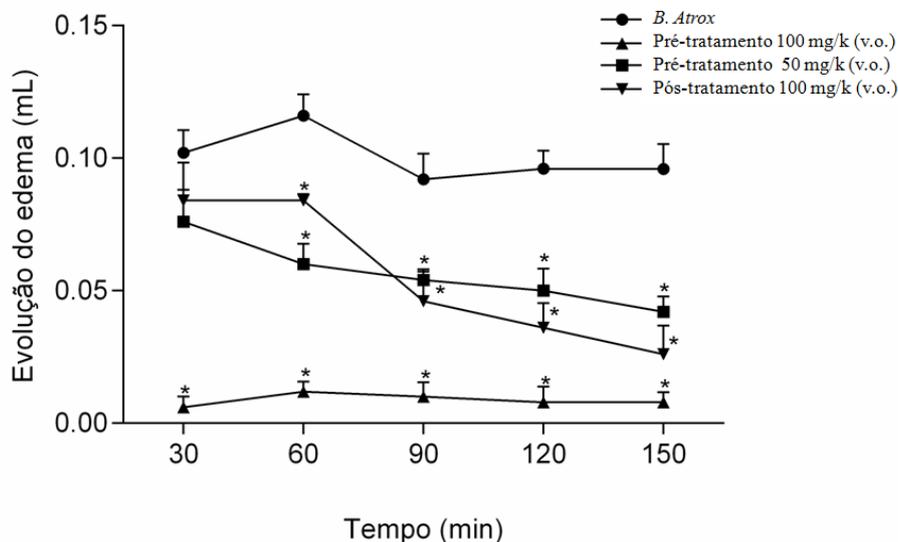


Fig. 2: Inibição da atividade edematogênica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox* (10 µg). * $p<0,05$ teste de Tukey, n=5/grupo.

3.5 Inibição da atividade hemorrágica

Os resultados obtidos na atividade hemorrágica induzida pela injeção de 2DMH da peçonha de *B. atrox* estão expressos na fig. 3. Como pode ser observado, os grupos que receberam TCPPr pré-incubado com a peçonha (1:5 e 1:10 - m:m) apresentaram uma redução significativa ($p<0,05$) de 55% e 74% da hemorragia, respectivamente. Já os grupos que receberam TCPPr (v.o.) nas doses de 100 e 50 mg/kg, antes da injeção de 2DMH da peçonha (pré-tratamento), apresentaram uma menor redução da hemorragia, (19% e 13% respectivamente), porém significativa ($p<0,05$). O grupo tratado com 100 mg/kg de TCPPr (v.o.) imediatamente após a injeção da peçonha (pós-tratamento) não foi observado inibição significativa do halo hemorrágico, quando comparado ao grupo controle.

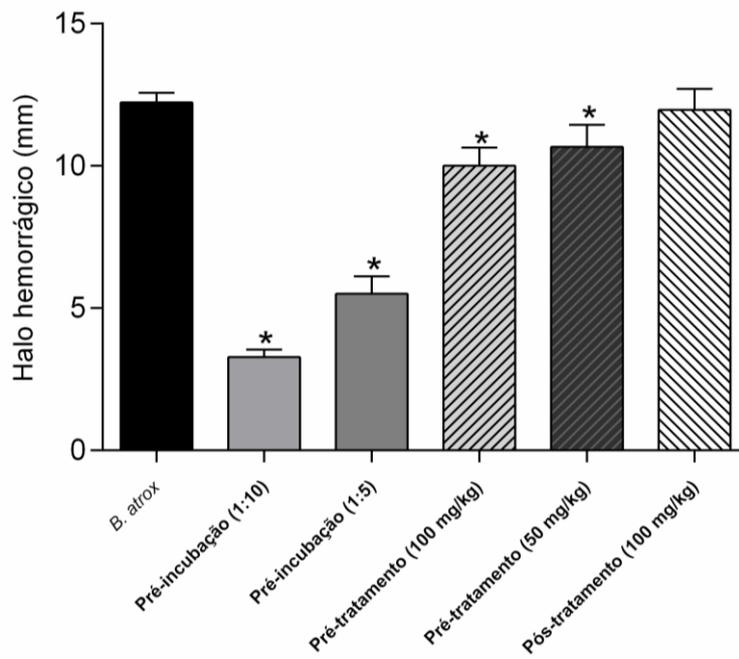


Fig. 3: Inibição da atividade hemorrágica induzida por 10 µg de peçonha de *Bothrops atrox* por TCPr utilizando diferentes protocolos de tratamentos. *= $p < 0.05$, teste de Tukey, $n=5$ /grupo.

3.6. Inibição da atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica A_2 induzida pela peçonha de *B. atrox* foi totalmente inibida pelo TCPr nas doses 1:5 e 1:10 (m:m). Na dose de 1:1 (m:m) a inibição foi de 88%, quando comparado ao controle.

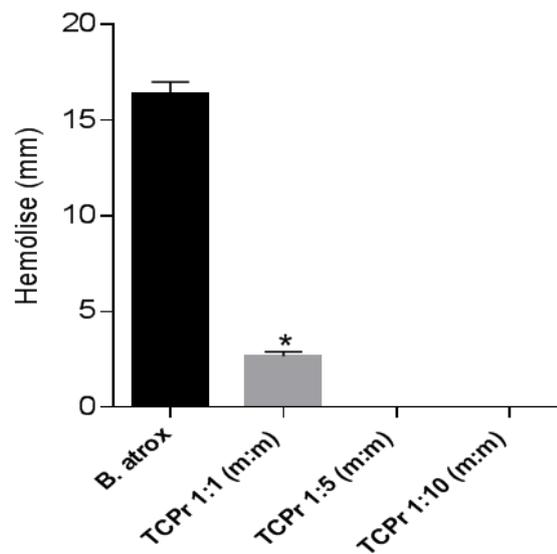


Fig. 5: Inibição da atividade fosfolipásica induzida por 2,5µg de peçonha de *Bothrops atrox*. * $p < 0,05$ teste de Tukey, $n=4$ /grupo.

3.7. Inibição da atividade coagulante

O TCPr inibiu completamente a atividade coagulante da peçonha de *B. atrox* nas doses de 1:5 e 1:10 (m:m), no tempo máximo de 120 segundos de observação. No entanto, quando testado na dose 1:1 (m:m), a redução foi de 44% ($p < 0,05$) do tempo de coagulação do plasma (tabela 3).

Tabela 3: Inibição da atividade coagulante da peçonha de *B. atrox* (4,5 µg) por TCPr. A peçonha e os extratos foram pré-incubados por 30 minutos a 37°C nas concentrações de 1:1, 1:5 e 1:10 (m:m).

Amostras	Atividade coagulante (min) ^a		
	1:1 (m:m)	1:5 (m:m)	1:10 (m:m)
<i>B. atrox</i>	12,4s ±0,7	-	-
<i>B. atrox</i> + TCPr	-	52,4,s ± 2,3	NC

^a Cada experimento representa a média ± desvio padrão em segundos. NC= não coagulou no tempo Máximo de 120s. * $p < 0,05$ teste de Tukey, n = 5/grupo.

4. Discussão

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam que os taninos condensados purificados do extrato aquoso de *P. reticulata* Benth (Fabaceae) por meio de cromatografia em coluna, apresentam atividade anti-inflamatória (fig. 2), atividade anti-hemorrágica (fig. 3) inibindo também as atividade fosfolipásica, (fig. 4) e atividade coagulante (tabela 3) da peçonha de *B. atrox*. Esses resultados são importantes, pois a *P. reticulata* é utilizada na medicina popular para tratar vítimas de acidentes ofídicos.

A atividade inflamatória aguda proveniente de acidentes botrópicos representa uma das maiores complicações do envenenamento (Strauch *et al.*, 2013), e é provocada por um conjunto de frações bioquimicamente heterogêneas (França e Malaqué, 2009) que têm atividade indireta, induzindo ou liberando mediadores vasoativos como bradicinina, histamina, prostaglandinas, lecotrienos, protosciclinas, que vão atuar de maneira complexa e inter-relacionada no processo inflamatório (Gutierrez *et al.*, 1986, Moreira *et al.*, 2012). Neste estudo, foi mostrado que o TCPr foi capaz de reduzir significativamente o edema provocado pela injeção da peçonha de *B. atrox* em protocolos *in vivo* (via oral). Esses resultados sugerem que o TCPr pode estar agindo sobre os mediadores da inflamação, inibindo sua ação. Muitos outros trabalhos demonstram a habilidade de extratos de plantas em inibir os efeitos inflamatórios provocados por peçonhas de serpentes, porém, a maioria desses testes utiliza

apenas protocolo de pré-incubação (Biondo *et al.*, 2003; Maiorano *et al.*, 2005; Moura *et al.*, 2013; Assafim *et al.*, 2011; Fernades *et al.*, 2011; Patiño, *et al.*, 2013).

As metaloproteases presentes na peçonha de serpentes são responsáveis pela atividade hemorrágica apresentada nos quadros de envenenamento (França e Maláque, 2009). Essas enzimas constituem um grande grupo de proteases dependentes de metais, principalmente os cátions divalentes como o zinco. Esse metal desempenha um importante papel na atividade proteolítica e, conseqüentemente, na atividade biológica dessas proteases (Teixeira *et al.*, 2005) Agentes quelantes podem agir sobre metaloproteínas, eliminando completamente sua atividade (Matsui *et al.*, 2000), assim, a inibição da ação da atividade enzimática dessa toxina pode estar relacionado com a captação do zinco no sítio catalítico, compostos fenólicos são capazes de quelar íons metálicos e tornar a enzima inativa (Costa, 2010). O TCPr foi eficaz na inibição da atividade hemorrágica proveniente da ação de metaloproteínas presentes na peçonha de *B. atrox*, porém somente em protocolo de pré-incubação, apresentando uma baixa redução quando administrado por via oral. Esses resultados sugerem que a inibição da atividade hemorrágica pode ser devido a interação entre o TCPr e as metaloproteínas da peçonha, atuando através do bloqueio do sítio ativo da metaloproteína e capturando o zinco, fundamental para a estrutura tridimensional, bem como para atividade enzimática da proteína (Da Silva, *et al.*, 2007). O que corrobora com resultados apresentados para o extrato rico em taninos de *Musa Paradisiaca* e para galocatequina e isoquercitrina, fenóis isolados de *Schizolobium parahyba*, que se mostraram eficazes em inibir a ação hemorrágica das peçonhas de *Bothrops jararacussu* *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* (Borges *et al.*, 2005; Vale *et al.*, 2008).

A fosfolipáse A₂ é uma enzima cálcio-dependente que compõe a peçonha das serpentes do gênero *Bothrops*. Segundo França e Malaqué (2009) pode estar relacionada com a atividade miotóxica, agravando os sintomas inflamatórios comuns após o acidente. Essas enzimas têm como substratos os fosfolipídeos presentes nas membranas celulares, e agem quebrando esses fosfolipídeos, liberando ácido graxos e lisofosfolipídeos, os ácidos graxos liberados, diminuem o pH tornando o meio ácido, essa reação juntamente com os lisofosfolipídios liberados induzem a lise dos eritrócitos, e intensifica os efeitos locais do envenenamento (Gutierrez *et al.*, 1988). O TCPr foi eficaz no bloqueio da atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. atrox* inibindo completamente a formação do halo hemolítico. Esses resultados sugerem que taninos podem estar atuando como um quelante do cálcio, presente na enzima, inativando sua atividade. Ticli *et al.* (2005) demonstraram a ação inibitória do ácido rosmarinico, um ácido fenólico isolado de *Cordia verbenácea*, contra a

atividade fosfolipásica de peçonha de *Bothrops jararaca*. Resultados semelhantes foram descritos por Moura *et al.*, (2013) que avaliaram a inibição da atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. atrox* utilizando os extratos aquosos de *Bellucia dichotoma*, *Connarus favosus* e *Plathymania reticulata*, espécies que possuem taninos na sua composição química. Assim como o resíduo aquoso de *Myrcia guianensis* que inibiu completamente a atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops jararaca* (Sousa *et al.*, 2013) e o extrato aquoso rico em taninos de *Musa paradisiaca* que inibiu 100% a atividade enzimática da fosfolipáse A₂ presentes nas peçonhas de *B. jararacossu* e *Crotalus durissus terrificus* (Borges *et al.*, 2005).

As serinoproteínases presentes na peçonha botrópica são capazes de hidrolizar diretamente o fibrinogênio em fibrina, formando um coágulo visível *in vitro* (Sano-Martins e Santoro, 2009). O TCPr inibiu também a atividade coagulante induzida pela peçonha de *B. atrox*. Essa inibição da atividade coagulante sobre o plasma pode ter ocorrido provavelmente por interação dos taninos com as serinoproteínases presentes na peçonha, enzimas responsáveis pela ação coagulante (Sano-Martins e Santoro, 2009). A interação entre taninos e proteínas ocorre, supostamente, através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e resíduos de aminoácidos da enzima (Monteiro *et al.*, 2005), podendo induzir modificações irreversíveis no sítio catalítico da serinoprotease, que necessita da conservação das interações químicas dos resíduos de aminoácidos para exercer sua ação tóxica (Borges *et al.*, 2001). Esses resultados corroboram com estudos realizados com algumas espécies de plantas cujos extratos também apresentam uma alta concentração taninos: *Stryphnodendron barbatiman*, *Myrcia guianensis*, *Bellucia dichotoma*, *Connarus favosus*, *Casearia sylvestris* que tiveram efeito inibitório sobre a atividade coagulante da peçonha das serpentes *Lachesis muta*, *Bothrops neuwied*, *Bothrops atrox*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops jararaca*. (Borges *et al.*, 2001; De Paula *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2013, Sousa *et al.*, 2013).

Embora a administração de soro antibotrópico seja ainda a única terapia preconizada pelo Ministério da Saúde para o tratamento de vítimas de acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, a soroterapia mostra-se ineficiente no combate ao dano local proveniente da ação de toxinas presentes nas peçonhas botrópicas (Lomonte *et al.*, 2009). Diante disso, a procura por inibidores naturais que possam atuar como complemento a soroterapia convencional, principalmente contra os efeitos locais do envenenamento, torna-se uma importante tarefa. Assim, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que taninos provenientes de *P. reticulata*, podem servir como novas estratégias que ajudem a reduzir os efeitos tóxicos provocados por peçonhas de serpentes, visando diminuir ou evitar as sequelas provenientes da ação das toxinas botrópicas.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTox).

Referências bibliográficas

- Ambikabothy J., Ibrahim H., Ambu S., Chakravarthi S., Khalijah Awang K., Vejayan J., 2011. Efficacy evaluations of *Mimosa pudica* tannin isolate (MPT) for its anti-ophidian Properties. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 257-262.
- Assafim, M., Coriolano, E.C., Benedito, S.E., Fernandes, C.P., Lobo J.F.R., Sanchez, E.F., Rocha, L.M., Fuly, A.L., 2011. *Hypericum brasiliense* plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom. *Journal of Venom Research* 2, 11-16.
- Assakura, M.T., Furtado, M.F., Mandelbaum, F.R., 1992. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*) Comparative. *Biochemistry Physiology* 102, 727-732.
- Bhattacharjee, P., Bhattacharyya, D., 2013. Characterization of the aqueous extract of the root of *Aristolochia indica*: Evaluation of its traditional use as an antidote for snake bites. *Journal of Ethnopharmacology* 145, 220-226.
- Biondo, R., Pereira, A.M.S., Marcussi, S., Pereira, P.S., França, S.C., Soares, A.M. 2003. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocinaceae) aqueous extract. *Biochimie* 85, 1017-1025.
- Borges, M.H., Soares, A.M; Rodrigues, V.M., Oliveira, F., Fransheschi, A.M., Rucavalo, A., Giglio, J.R., Homs-Brandeburgo, M.I., 2001. Neutralization of protease from *bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon* 39, 1863-1869.
- Borges, M.H., Alves, D.L.F., Raslan, D.S., Piló-Veloso, D., Rodrigues, A.M., Homs-Brandeburgo, M.I., De-Lima, M.E., 2005. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 21-29.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* 2, 248-254.
- Cavalcante, W.L.G., Campos, T.O., Pai-Silva, M.D; Pereira, P.S., Oliveira, C.Z., Soares, A.M; Gallacci, M., 2007. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 490– 497.
- Collaço R. C. O., Cogo, J.C., Rodrigues-Simioni L., Rocha T., Oshima-Franco Y., Randazzo-Moura, P., 2012. Protection by *Mikania laevigata* (guaco) extract against the toxicity of *Philodryas olfersii* snake venom. *Toxicon* 60, 614-622.

- Costa, T.R., 2010. Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e Caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico. Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo.
- Da Silva, J.O., Fernandes, R. S.; Ticli, F. K., Oliveira, C. Z., Mazzi, M. V., Franco, J. J., Juliatti, S., Pereira, P. S., Soares, A. M., Sampaio, S. V., 2007. Triterpenoids saponins, new metalloproteinase snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon* 50, 283-291.
- De Paula, R.C., Sanchez, E.F., Costa, T.R., Martins, C.H.G., Pereira, O.S., Lourenço, M.V., Soares, A.M., Fuly, A. 2010. Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 16, 311-326.
- Dougherty. E.R., 2002. An Introduction to Morphological Image Processing. SPIE, The International Society for Optical Engineering: Bellingham.
- Dougherty E.R., Lotufo RA., 2003. Hands-On Morphological Image Processing. Bellingham: SPIE, The International Society for Optical Engineering, 2003.
- 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., 2011. Inhibition of *Bothrops jararacussu* venom activities by *Plathymenia reticulata* Benth. extracts. *Journal of Venom Research* 2, 52-60.
- Fernandes, R.S.; Costa, T.R, Marcussi, S.; Bernardes, C.P.; Menaldo, D.L. González, R.; 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* 17(1), p. 85-93,2011
- França, F.O.S., Málaque, M.S., 2009. Prefácio. In: Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Sarvier, São Paulo p.82.
- Guerra C.E., Xavier A.R., Andrade A.J.N., 2011. Watershed Threshold and Gray Level Morphology Applied to Object Detecting in Remote Sensing and Petrographics images. 12^o International. Congress. of the Brazilian. Geophysical Society., Rio de Janeiro, Brasil.
- Gutiérrez, J.M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26, 411-413.
- Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J.A., Cerdas, L. 1986. Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rica snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comparative Biochemistry Physiology* 85, 171-175.
- Izidoro, L. F. M., Rodrigues, V.M., Rodrigues, R. S., Ferro, E.V., Amaguchi, A., Giglio, J. R., Homsí-Brandeburgo, M.I. , 2003. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). *Biochimie* 85, 669 - 675.

- Kondo, H., Kondo, S., Ikesawa, I., Murata R., Ohsaka, A., 1960. Studies of the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 13, 43-51.
- Lomonte, B., Leon, G., Ângulo, Y., Rucavado, A., Nuñez, V., 2009. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contribution to understanding snakebite envenomings and their treatment. *Toxicon* 54, 1012-1028.
- Lorenzi, H., 2002. Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Nova Odessa.
- Magalhães, A.; Santos G.B.; Verdam, M.C.S.; Fraporti, L.; Malheiro, A.; Lima, E.S.; Dos-Santos M.C., 2011 Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. *Journal of Ethnopharmacology* 134, p. 82-88.
- Maiorano, V.A., S. Marcussi, M.A.F., Daher, C.Z; Oliveira, L.B., Couto, O.A., Gomes, S.C., França, A.M., Soares, P.S. Pereira. 2005. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *Journal Ethnopharmacology* 102, 364-370.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 7, 146-156.
- Mole, S.; Waterman, P.G., 1987. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia* 72, 137-156.
- Monika W., Joseph, S., Teresa, K., 2008. Thin layer chromatography in phytochemistry. *Chromatographic science* v 99.
- Monteiro, J.M.; Albuquerque, U.P.; Araújo, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28 (5) p. 892-896, 2005.
- Moreira, V., Dos-Santos, M.C., Nascimento, N.G., Silva, H.B., Fernandes, M.C., Lima, M.R.D., Teixeira, C., 2012. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators, *Toxicon* 60, p. 15-20.
- Morim, M.P. *Plathymenia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB83636>>. Acesso em: 28/02/2014
- Mors, W.B.; Nascimento, M.C.; Pereira, B.M.R.; Pereira, N.A., 2000 Plant natural products active against snake bite. *Phytochemistry* 55, p. 627-642.
- Moura, V.M., Sousa, L.A.F., Oliveira, R.B., Moura da Silva, A.M. Chalkidis, H.M. Silva, M.N., Pacheco, S., Mourão, R.H.V., 2013. Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 7 (31), 2330-2337.
- Patiño A.C., Benjumea D.M., Pereañez, J.A, 2013. Inhibition of venom serineproteinase and metalloproteinase activities by *Renalmia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and in vitro propagated plants. *Journal of Ethnopharmacology* 149, 590-596.

Silva, N.L.A., Miranda, F.A.A., Conceição, G.M., 2010. Triagem fitoquímica de plantas do cerrado, da área de proteção ambiental do Inhamun, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena* 6.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2001. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Sousa, L.A.F., Moura, V.M., Raposo, J.D.A. Sousa, L.F. Oliveira, R.B., Santos, L.S Araújo, R.N.M., Moura da Silva, A.M., Aranha, E.P., Suemitsu, C., Guerra, C.E., Chalkidis, H.M. Silva, M.N., Pacheco, S., Mourão, R.H.V., 2012. The effect of the aqueous extract of *Myrcia guianensis* (Aubl) DC and its fractions against the hemorrhagic activity of *Bothrops jararaca* venom. *Journal of Medicinal Plants Research* 7(42), 3139-3146.

Strauch, M.A., Tomaz, M.A., Machado M.M., Ricardo, H.D., Cons, B.L., Fernandes F.F.A., El-Kik, C.Z., Azevedo, M.A., Melo, P.A., 2013. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. *Journal of Ethnopharmacology* 145, 50–58.

Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I., 1998. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46 (10), 4267-4274.

Teixeira, C.F.P.; Fernandes, C.M.; Zuliani, J.P., 2005. Zamuner, S.F., Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100.

Ticli, F.K., Hage, L.I.S., Cambraia, R.S., Pereira, P.S., Magro, A.J., Fontes, M.R.M, Stábéli R.G., Giglio, J.R., França, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon* 46, 318-327.

Vale, L.H., Mendes, M.M., hamaguchi, A., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Homs-Brandeburgo, M.I, 2008. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. *Basic Clinical Pharmacology and toxicology* 103, 104-107.

Wagner, H.; Bladt, S., 1996. *Plant Drug Analysis- A thin Layer Chromatography Atlas*. 2 ed. Springer, Berlin.

Yamakawa, S.A., Nozaki, M., Hokawa, Z., 1976. Fractionation of Sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. pp. 97-109. In: Ohsaka A, Hayashi K, Saway QY (Eds). *Animal, plant and microbial toxins*. New York, Plenum, pp 555.

Young, H., Paterson, V.J., 1980. Condensed tannins from white clover seed diffusate. *Phytochemistry* 19, 159-160.

SÍNTESE INTEGRADORA

Um número relativamente alto das drogas de origem natural foram descobertas a partir de estudos químicos de plantas utilizadas na medicina popular. O extrato aquoso de *P. reticulata* possui um alto teor de taninos condensados, aos quais foram atribuídos às propriedades antiofídicas da espécie. Os resultados obtidos nesse trabalho reforçam a importância do conhecimento tradicional para a descoberta de novos fitoterápicos. No entanto, a continuidade dos estudos direcionados para a elucidação estrutural dos taninos, bem como para os possíveis mecanismos de interação desses taninos com as proteínas da peçonha ainda é necessário.

ANEXOS

Anexo I: Protocolo do comitê de ética

Anexo II: Normas da revista toxicon