



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



RAYANE GABRIELLE BRASIL DE VASCONCELOS

POTENCIAL ANTI-HEMORRÁGICO E ANTI-HIALURONIDASE DE PRODUTOS
NATURAIS E DERIVADOS CONTRA A PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas*

João Pessoa – PB

2024

RAYANE GABRIELLE BRASIL DE VASCONCELOS

POTENCIAL ANTI-HEMORRÁGICO E ANTI-HIALURONIDASE DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS CONTRA A PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Orientadora: Profa. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna

Coorientadora: Profa. Ma. Ellynes Amâncio Correia Nunes

João Pessoa - PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

V331p Vasconcelos, Rayane Gabrielle Brasil de.
Potencial anti-hemorrágico e anti-hialuronidase de produtos naturais e derivados contra a peçonha de *Bothrops erythromelas* / Rayane Gabrielle Brasil de Vasconcelos. - João Pessoa, 2024.
47 f. : il.

Orientação: Karla Patrícia de Oliveira Luna.
Coorientação: Ellynes Amâncio Correia Nunes.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Produtos naturais - Atividade antiinflamatória.
2. Produtos naturais - Atividade anti-hemorrágica. 3. Etnobotânica - Toxina - Jararaca. I. Oliveira Luna, Karla Patrícia de. II. Nunes, Ellynes Amâncio Correia. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)



Ata da Sessão Pública da Defesa de Dissertação de Mestrado da discente **Rayane Gabrielle Brasil de Vasconcelos**, candidata ao Título de Mestre em Biologia Celular e Molecular - Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

1 Aos vinte e três dias do mês de Fevereiro de dois mil e vinte e quatro, às nove horas,
2 reuniram-se, no Auditório do Departamento de Biologia Molecular - CCEN/UFPB, os
3 membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores: Karla Patrícia de
4 Oliveira Luna (Orientadora/Presidente), Augusto Cézar Vasconcelos de Freitas Júnior
5 (Examinador interno) e Harley da Silva Alves (Examinador externo) constituída para
6 examinar a candidata **Rayane Gabrielle Brasil de Vasconcelos** ao grau de Mestre em Biologia
7 Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular. Iniciando a
8 sessão, na qualidade de Presidente, a Professora Doutora Karla Patrícia de Oliveira Luna
9 comunicou aos presentes a finalidade da reunião. A seguir, concedeu a palavra para que
10 o candidato fizesse, oralmente, a exposição do trabalho intitulado “*POTENCIAL*
11 *ANTICOAGULANTE E ANTI-HIALURONIDASE DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS*
12 *CONTRA A PEÇONHA DE Bothrops erythromelas*”. Concluída a exposição, a candidata foi
13 arguida pela Banca Examinadora, que sugeriu alteração do título da dissertação que, acatada
14 pela orientadora, passou a ser “*POTENCIAL ANTI-HEMORRÁGICO E ANTI-*
15 *HIALURONIDASE DE PRODUTOS NATURAIS CONTRA A PEÇONHA DE Bothrops*
16 *erythromelas*”. Após arguição a banca examinadora avaliou, julgou e proferiu o seguinte
17 parecer: “**aprovada**”. Ao final da sessão, a orientadora preencheu a Ficha de
18 Avaliação e emitiu o Relatório Final, para serem encaminhados ao Colegiado deste
19 Programa para homologação. E, para constar, eu, Eleonidas Moura Lima, Coordenador do
20 PPGBCM, lavrei a presente ata, que assino junto com o candidato e os membros da
21 Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 KARLA PATRICIA DE OLIVEIRA LUNA
Data: 26/02/2024 11:47:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Karla Patrícia de Oliveira Luna
Orientadora / Presidente

Documento assinado digitalmente
 HARLEY DA SILVA ALVES
Data: 26/02/2024 22:59:19-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Harley da Silva Alves
Examinador Externo

Documento assinado digitalmente
 ELEONIDAS MOURA LIMA
Data: 26/02/2024 10:11:26-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Eleonidas Moura Lima
Coordenador

Documento assinado digitalmente
 AUGUSTO CEZAR VASCONCELOS DE FREITAS JI
Data: 25/02/2024 15:36:56-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Augusto Cézar Vasconcelos de Freitas Júnior
Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
 RAYANE GABRIELLE BRASIL DE VASCONCELOS
Data: 27/02/2024 08:34:27-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Rayane Gabrielle Brasil de Vasconcelos
Discente

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha sincera gratidão às seguintes pessoas e instituições, cujo apoio e contribuições foram fundamentais para a realização deste trabalho:

Agradeço profundamente a minha orientadora, Karla Patrícia de Oliveira Luna, pela orientação valiosa, confiança e incentivo ao longo de todo o processo de pesquisa.

À minha coorientadora por toda paciência, prontidão e ensinamentos valiosos nesse projeto que serão estendidos à toda minha vida acadêmica

À minha família, pelo amor incondicional, apoio emocional e compreensão durante os momentos desafiadores desta jornada. Seu encorajamento foi crucial para que eu pudesse me dedicar a este projeto.

Agradeço aos meus colegas de estudo em particular Ely Suney, que embarcou nessa comigo e encerraremos juntas também, por todo compartilhamento de ideias, discussões e desafios acadêmicos. Sua colaboração enriqueceu minha experiência de aprendizado, e tornou tudo um pouco mais leve.

À Universidade Federal da Paraíba pela infraestrutura e recursos disponibilizados, que foram essenciais para a realização desta pesquisa. Agradeço também aos professores e funcionários pela dedicação ao ensino e suporte institucional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela valiosa contribuição que tornou possível a execução e obtenção dos resultados, de forma a evoluir o projeto do papel e dando um passo para torna-lo realidade.

Aos colegas do LABVENOM, cuja colaboração foi crucial para a coleta de dados.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu profundo agradecimento. Este projeto não teria sido possível sem o apoio e contribuições de cada um de vocês.

RESUMO: O ofidismo representa um grave problema de saúde nos trópicos. Neste contexto, a problemática dos acidentes ofídicos ultrapassa os números relativos à mortalidade, e está relacionada com sequelas graves, que inviabilizam o cotidiano de muitas das vítimas. A serpente *Bothrops erythromelas* é a principal responsável por acidentes ofídicos no bioma da caatinga, porém esta espécie não está incluída no *pool* utilizado na produção do soro antiofídico. Considerando as limitações do soro antiofídico, diversos estudos têm sido realizados a fim de desenvolver tratamentos complementares para o ofidismo e, neste contexto, as plantas constituem uma importante fonte de compostos bioativos. Assim, foi proposto avaliar a capacidade de extratos brutos de *Doyerea emetocathartica*, *Cnidosculus quercifolius* e dos ácidos rosmarínico e clorogênico em inibir a atividade hemorrágica, bem como a atividade hialuronidásica da peçonha de *Bothrops erythromelas*. Inicialmente foi usada as metodologias de Tempo de protrombina e Tromboplastina parcial ativada para avaliar a integridade da cascata de coagulação *in vitro*. Em seguida, para aferir a preservação do ácido hialurônico *in vitro* foi aplicado o método turbidimétrico. Os resultados obtidos demonstraram atividade de inibição com significativas em todas as concentrações na redução do tempo de protrombina com os extratos de *Doyerea emetocathartica* e *Cnidosculus quercifolius* (93,3% e 94,01%) e ácido rosmarínico e clorogênico (94,5% e 94,01%). Bem como foi eficaz na redução do tempo de Tromboplastina parcial ativada atingindo em *Doyerea emetocathartica* e *Cnidosculus quercifolius* (95,16% e 95,14%) e ácido rosmarínico e clorogênico (96,02% e 95,52%). Ao avaliar o potencial anti-hialuronidásico todos os compostos de origem vegetal foram capazes de manter a integridade do substrato, *Doyerea emetocathartica* e *Cnidosculus quercifolius* (2.811 ABS e 1.819 ABS) e ácido rosmarínico e clorogênico (0.5 ABS e 1.57 ABS). Diante deste cenário, os resultados demonstram que os extratos são bons candidatos ao tratamento adjuvante de acidentes ofídicos por *Bothrops erythromelas*, e também podem ser promissores para pesquisas que visam o desenvolvimento independente de medicamentos anti-hemorrágicos e potencial anti-inflamatório.

Palavras-chave: Etnobotânica toxina, jararaca, atividade anti-hemorrágica, atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT: Snakebite represents a serious health problem in the tropics. In this context, the problem of snakebites goes beyond the numbers related to mortality, and is related to a serious sequelae, which makes daily life impossible for many of the victims. The *Bothrops erythromelas* snake is the main responsible for snakebites in the caatinga biome, but this species is not included in the pool used in the production of antivenom. Considering the limitations of antivenom, several studies have been carried out to develop complementary treatments for snakebite and, in this context, plants constitute an important source of bioactive compounds. Thus, it was proposed to evaluate the capacity of crude extracts of *Doyerea emetocathartica*, *Cnidosculus quercifolius* and rosmarinic and chlorogenic acids to inhibit the hemorrhagic activity, as well as the hyaluronidase activity of *Bothrops erythromelas* venom. Initially, the Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin methodologies were used to evaluate the integrity of the in vitro coagulation cascade. Then, to measure the preservation of hyaluronic acid in vitro, the turbidimetric method was applied. The results obtained demonstrated significant inhibition activity at all concentrations in reducing prothrombin time with extracts of *Doyerea emetocathartica* and *Cnidosculus quercifolius* (93.3% and 94.01%) and rosmarinic and chlorogenic acid (94.5 % and 94.01%). It was also effective in reducing activated partial thromboplastin time in *D. emetocathartica* and *Cnidosculus quercifolius* (95.16% and 95.14%) and rosmarinic and chlorogenic acid (96.02% and 95.52%). When evaluating the anti-hyaluronidase potential, all compounds of plant origin were able to maintain the integrity of the substrate, *Doyerea emetocathartica* and *Cnidosculus quercifolius* (2,811 ABS and 1,819 ABS) and rosmarinic and chlorogenic acid (0.5 ABS and 1.57 ABS). Given this scenario, the results demonstrate that the extracts are good candidates for the adjuvant treatment of snakebites caused by *Bothrops erythromelas*, and may also be promising for research aimed at the independent development of anti-hemorrhagic drugs and anti-inflammatory potential.

Keywords: Ethnobotany, toxin, jararaca, anti-hemorrhagic activity, anti-inflammatory activity.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	OBJETIVOS	18
2.1.	Objetivo geral	18
2.2.	Objetivos específicos	18
3.	RESULTADOS (Artigo)	19
3.1	RESUMO	20
3.2	ABSTRACT	21
3.3.	INTRODUÇÃO	22
3.4.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.4.1	Obtenção dos materiais	25
3.4.1.1	Obtenção e quantificação da peçonha bruta.....	25
3.4.1.2	Plasma humano.....	25
3.4.1.3	Extratos vegetais	26
3.4.1.3.1	<i>Cnidoscylus quercifolius</i>	26
3.4.1.3.2	<i>Doyerea ementocathartica</i>	26
3.4.1.3.3	<i>Compostos purificados</i>	26
3.4.2	Atividade pro coagulante	27
3.4.3	Inibição da atividade hialuronidásica	28
3.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.5.1	Atividade pró coagulante	28
3.5.2	Inibição da atividade hialuronidásica	35
3.6.	CONCLUSÃO	38
3.7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
4.	CONCLUSÃO	44
5.	REFERÊNCIAS	45
6.	ANEXOS	49

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1.	Exemplar de <i>Bothrops erythromelas</i>	11
Figura 2.	Padrão de distribuição de <i>Bothrops. erythromelas</i>	12
Figura 3.	Esquema simplificado da cascata de coagulação.....	13
Figura 4.	Partes aéreas de exemplar de <i>D. emetocathartica in situ</i>	14
Figura 5.	Partes aéreas de exemplar de <i>C. quercifolius in situ</i>	15
Figura 6:	Desenho molecular do ácido rosmarínico.....	16
Figura 7	Desenho molecular do ácido clorogênico.....	17
Figura 8.	Tempo de protrombina (TP) do plasma humano frente a peçonha de <i>B. erythromelas</i> associado a candidatos a tratamento adjuvante de origem vegetal.....	30
Figura 9.	Tempo de protrombina (TP) do plasma humano contra peçonha de <i>B. erythromelas</i> associado a candidatos a tratamento adjuvante derivados de origem vegetal.....	31
Figura 10.	Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) do plasma humano frente a peçonha de <i>B. erythromelas</i> associado a candidatos a tratamento adjuvante de origem vegetal.	33
Figura 11.	Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) do plasma humano frente a peçonha de <i>B. erythromelas</i> associado a candidatos a tratamento adjuvante derivados de origem vegetal.	34
Figura 12.	Avaliação do desempenho inibitório da degradação do ácido hialurônico causada pela peçonha de <i>B. erythromelas</i> em diferentes concentrações....	36
Figura 13.	Avaliação do desempenho inibitório da degradação do ácido hialurônico causada pela peçonha de <i>B. erythromelas</i> em diferentes concentrações de ácidos derivados de produtos vegetais.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AH	Ácido hialurônico
AR	Ácido Rosmarínico
AC	Ácido Clorogênico
<i>B.e.</i>	<i>Bothrops erythromelas</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<i>D.e.</i>	<i>Doyerea emetocathartica</i>
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
EB	Extrato bruto
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
SAB	Soro antibotrópico
TC	Tempo de coagulação
TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada

1. INTRODUÇÃO

Epidemiologia

A incidência de acidentes ofídicos é historicamente documentada de forma precária pelo sistema de saúde nacional. Este panorama reflete uma realidade de subnotificações e desinformação generalizada, de modo a se concretizar em um número incerto de acidentes e com efeitos insatisfatoriamente tratados. Ainda no que concerne a essa temática, em defluência aos expressivos impactos nocivos do ofidismo, desde 2009, tais acometimentos são classificados como uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017) (DTN) cuja estimativa é de cerca de 2,7 milhões de acidentes ofídicos com humanos anualmente no mundo (Féliz-Silva; Silva-Junior; Zuculotto, 2017). No panorama global de incidência de ofidismo, o Brasil é o terceiro país com mais registros de acidentes. Assim, representando acidentes graves que causam mais de 40.000 (quarenta mil) mutilações anuais, e variando de 25.000 (vinte e cinco mil) a 125.000 (cento e vinte e cinco mil) casos que evoluem a óbito (Gómez-Betancur et al., 2019; Dal Belo et al., 2013).

No Brasil, em 2020, acidentes por serpentes peçonhentas, são majoritariamente causados por serpentes do gênero *Bothrops*, atingindo cerca de 70% dos registros anuais (BRASIL, 2024).

Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* compreende cerca de 32 espécies de serpentes, distribuídas por todo o território nacional. Caracterizado pela grande variedade morfológica entre os representantes de cada espécie, cujo comprimento pode variar de 50 cm até 1.5 metros a depender da espécie, localização e sexo. Outra marca dessa variedade é o policromatismo (variação nos padrões tons das cores) mesmo entre membros da mesma espécie (Bôto, 2016).

Nas serpentes do gênero *Bothrops* cerca de 90% do peso seco dessas peçonhas é composto por parcelas proteicas e peptídicas, podendo estas ser enzimáticas ou não como: serino-peptidases, metalopeptidases, L-aminoácido oxidase, fosfolipases, hialuronidases, desintegrinas, lectinas de tipo C e peptídeos natriuréticos (Nunes et al. 2019).

Fosfolipases

As fosfolipases (PLA₂) são enzimas de variados tamanhos, presentes em uma série de atividades celulares, a exemplo da hidrólise fosfolipídeos de membrana, gerando precursores de mensageiros em processos inflamatórios (Castro, 2011). Como resultado da hidrólise do 2-

acil éster de fosfolipídios mediada pelas PLA₂ decorre a liberação de produtos como os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres. Esse processo resulta na liberação do ácido araquidônico, precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, iniciando uma série de reações inflamatórias (Nunes et al, 2019).

Metalopeptidases

As metalopeptidases são enzimas do tipo endopeptidases que dependem da ligação com um metal ionizado, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico para a manifestação das atividades enzimáticas (Castro, 2011). Entre as atividades desencadeadas pelas metalopeptidases estão descritas mionecrose no local do acidente, hemorragias e reações inflamatórias (Silva et al, 2011).

Serinopeptidases

As serinoproteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas utilizando mecanismos covalentes de catálise, através de uma tríade de resíduos formada por histidina, ácido aspártico e serina (His, Asp e Ser). As serinoproteases presentes na peçonha botrópica são caracterizadas como enzimas que tem atividade do tipo trombina) e de maneira geral afetam a cascata de coagulação pela ativação dos componentes sanguíneos envolvidos na coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária e também pela degradação proteolítica das células, causando um desequilíbrio no sistema hemostático da presa (Silva et al, 2011).

Hialuronidases

No envenenamento, esta classe de enzimas atua na degradação do ácido hialurônico presente na matriz extracelular (MEC) de tecidos conectivos frouxos, perturbando a sua integridade e facilitando a disseminação de toxinas para além do local da mordedura. Devido a essa propriedade, são conhecidas como “fatores de espalhamento”, potencializando a ação tóxica de outras toxinas ao facilitar a sua distribuição (Boldrini-França et al., 2017; Kemparaju; Girish, 2006). Adicionalmente, os oligossacarídeos resultantes da sua hidrólise podem desencadear efeitos hemostáticos (Kemparaju; Girish, 2006).

Fisiopatologia do ofidismo botrópico

O ofidismo botrópico desencadeia três atividades comuns: 1) proteolítica, que desenvolve edema e reação inflamatória na região da inserção da peçonha; 2) coagulante, atua

através de uma ou mais ações como *trombina simile* (similar a trombina), ativadora de protrombina e do fator X, promovendo consumo dos fatores de coagulação com consequente alteração da coagulação sanguínea; 3) hemorrágica, que atua no endotélio vascular na região do acidente e, provavelmente, também à distância. Outras atividades que podem participar da fisiopatologia do envenenamento são a fibrinogenolítica, fibrinolítica e agregadora de plaquetas. Neste sentido, alguns estudos têm trazido evidências pré-clínicas de que os soros anti botrópicos utilizado no Brasil podem não neutralizar completamente as atividades tóxicas de todas as peçonhas botrópicas, sugerindo que novas abordagens sejam empregadas para mitigar os efeitos danosos dos acidentes como é o caso da *Bothrops erythromelas* (Féliz-Silva; Silva-Junior; Zuculotto, 2017).

Bothrops erythromelas

Bothrops erythromelas (Amaral, 1923) (**FIGURA 1**), pertencente da família Viperidea popularmente conhecida como “Jararaca-da-seca”, e principal representante do gênero *Bothrops* na Caatinga. Caracterizada como uma serpente de pequeno porte, com cerca de 50 cm de comprimento, hábitos noturnos, dieta generalista e cor castanho-avermelhada (Bôto, 2016).

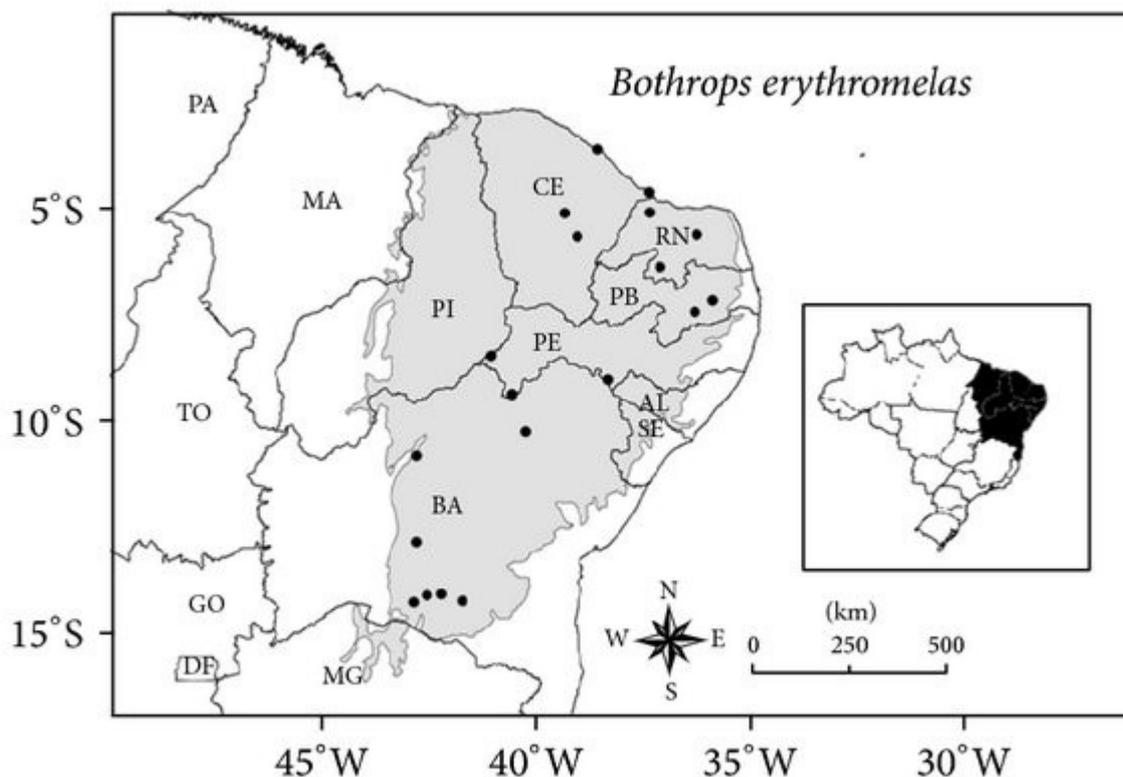
Figura 1: Exemplar de *Bothrops erythromelas*



Fonte: Acervo de pesquisa, equipe de pesquisa.

A distribuída em áreas de baixa altitude, em regiões secas e úmidas, com hábitos arbóreos, arbustivos e herbáceos. No entanto, pode ser encontrada também em bordas de floresta no nordeste da Mata Atlântica, nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Bahia, possivelmente em decorrência do desmatamento dessas áreas (Guedes et al., 2014) (**FIGURA 2**).

Figura 2: Padrão de distribuição de *Bothrops erythromelas*

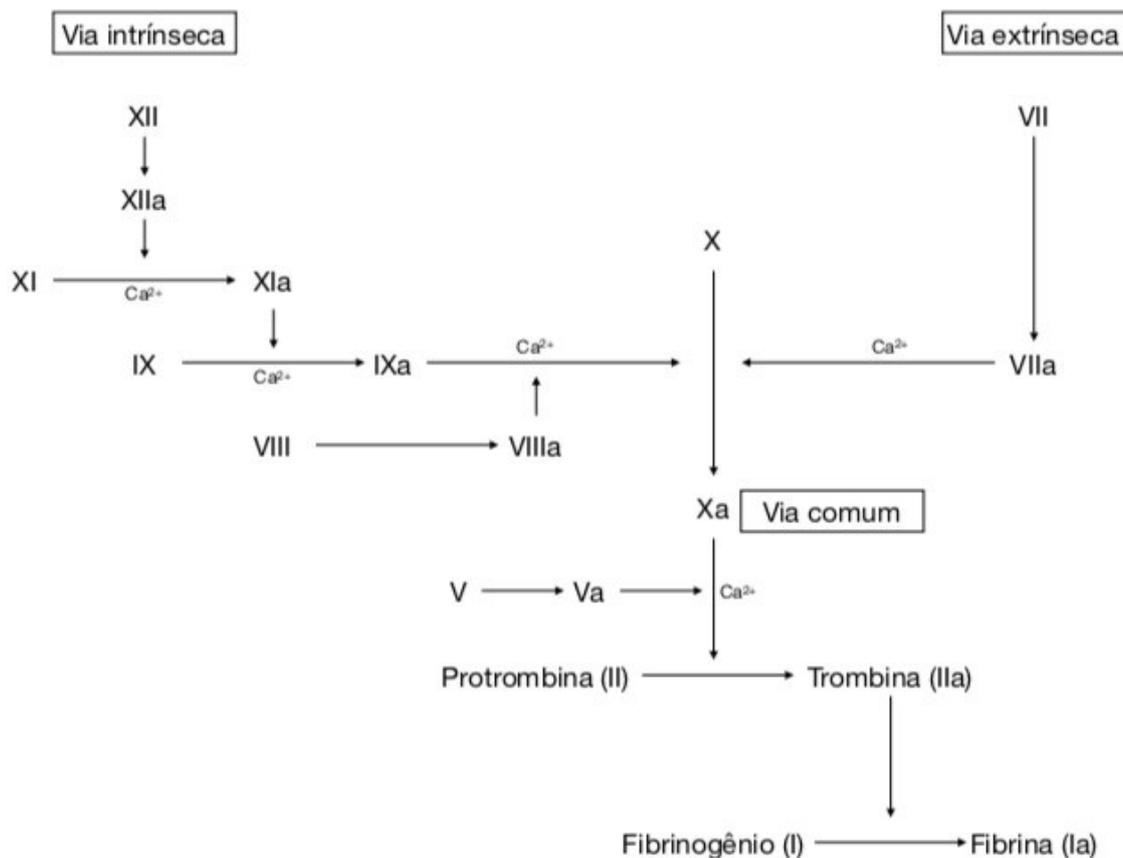


Fonte: Alberto Barros et al, 2014.

Apesar de sua relevante distribuição e de ser a principal responsável pelos acidentes ofídicos na região Nordeste, sua peçonha não faz parte do *pool* utilizado para a fabricação do soro antiofídico (Bôto, 2016) fato este que pode resultar na evasão de parcela de sintomas da neutralização sorológica com frações proteicas com massa molecular de 24, 29, 31, 36, 55 e 100 KDa, as quais não inibidas pelo tratamento convencional (Nunes et al., 2019).

Um das suas características mais marcantes da peçonha de *B. erythromelas* consiste na alta atividade coagulante em comparação às demais do gênero *Bothrops*, além de não exibir ação similar à trombina (serinopeptidases que atuam diretamente sobre a molécula de fibrinogênio convertendo-a em fibrina), o que resulta em graves efeitos adversos na hemostasia (Silva, 2018). A peçonha induz mudanças hemostáticas que envolvem hipercoagulabilidade sanguínea, seguida por incoagulabilidade sanguínea onde a análise histológica revela um quadro hemorrágico sistêmico, afetando principalmente os pulmões, rins e fígado (Bôto, 2016; da Silva et al, 2022). A atividade coagulante presente na peçonha de *B. erythromelas* é atribuída a presença de toxinas pró coagulantes, ativadoras dos fatores II e X (Protrombina), que levam a formação de trombina endógena, resultando em um quadro de coagulação intravascular disseminada (Silva, 2018).

Figura 3: Esquema simplificado da cascata de coagulação



Fonte: sp.unifesp.br

Ademais, a peçonha botrópica contém em sua constituição enzimas como a hialuronidases que favorecem a hidrólise do ácido hialurônico (AH), um polissacarídeo longo e linear disperso na matriz extracelular. Desse modo, é capaz de desencadear uma das vias conhecidas de processo inflamatório por dano da matriz extracelular, correlato a potencialização da disseminação das toxinas da peçonha para a circulação e compartimentos locais do organismo acometido. (Boldrini-França et al., 2017; Silva, 2018).

Etnobiologia

Os estudos de bioprospecção de plantas estimulam a pesquisa e exploração da biodiversidade de uma região, em associação ao conhecimento tradicional representa uma fonte inesgotável para obtenção de novos compostos naturais com potencial para produção de novos medicamentos, sejam estes fitoterápicos ou princípios ativos isolados (Ióca et al., 2018).

Considerando tais efeitos adversos, é importante considerar o uso mitigatório de estratégias botânicas em muitas comunidades rurais. O potencial químico estrutural e molecular de produtos vegetais é amplamente explorado pela medicina tradicional, dentro das mais

diversas culturas de todos os continentes do planeta. Essas práticas têm sido estudadas, o que em muitos casos corrobora e aperfeiçoa este potencial através da tecnologia farmacológica nos tratamentos de sintomas, assim como dos efeitos sistêmicos causados por esses padecimentos. Desse modo, a percepção da diversidade vegetal ímpar do Brasil, que compreende cerca de 23% das espécies vegetais identificadas no planeta, evidencia a competência da flora local na busca por soluções naturais para os mais diversos modos de padecimentos (Fontana et al., 2021). Podendo, nesse caso, se aplicar os efeitos locais e sistêmicos causados pela peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*.

Entre as espécies vegetais de interesse em estado bruto estão a *Doyerea ementocathartica* e *Cnidosculus quercifolius*:

Doyerea ementocathartica

A espécie *Doyerea ementocathartica* (**FIGURA 4**), integrada na família Cucurbitaceae, popularmente conhecida como batata de teiú ou cabeça-de-negro, é uma espécie endêmica do Brasil, amplamente distribuída na região nordeste. Onde há registros do emprego popular da raiz tuberosa de *D. ementocathartica* como de purativo do sangue, no tratamento de manchas de pele e para coceira e no combate a dores (Videres, 2017; Pereira, 2017; Silva et al., 2015).

Figura 4: Partes aéreas de exemplar de *D. ementocathartica* *in situ*



Fonte: Acervo de pesquisa, elaborado pela equipe de pesquisa.

A nomenclatura tradicional utilizada se origina da crença popular do poder antiofídico dessa espécie vegetal quando ingerida após empoçonhamento do réptil da família Teiidae conhecido como Teiú (Costa-Neto, 2000).

A investigação do uso de *D. ementocathartica* na medicina tradicional se lastreia na presença de moléculas bioativas de interesse para a saúde humana como a presença de proteínas

com ação inseticida e antimicrobiana, e os possíveis efeitos deletérios associados em células humanas. A ausência de informações científicas sobre esta espécie justifica a urgência por estudos que elucidem a composição química e propriedades biológicas de seus tecidos (Videres, 2017; Silvestre et al., 2021).

Cnidosculus quercifolius

A espécie *Cnidosculus quercifolius* (Pohl) (**FIGURA 5**), pertencente à família Euphorbiaceae conhecida popularmente como “faveleira” é uma forrageira amplamente disseminada no bioma da caatinga.

Figura 5: Partes aéreas de exemplar de *C. quercifolius* *in situ*



Fonte: Acervo de pesquisa, elaborado pela equipe de pesquisa.

Os estudos sobre a *C. quercifolius* são em sua maioria voltados para o uso agrícola e pecuário, assim, são escassos os estudos com enfoque na atividade biológica (Ribeiro et al., 2020). Entretanto a medicina popular faz uso do decocto e o macerado da casca do caule contra inflamações dos ovários e da próstata (Agra et al., 2008) e contra dor de dente (Roque et al., 2010).

Estudos recentes têm abordando o potencial antioxidante de extratos de *C. quercifolius* mostrando a presença de metabólitos capazes de sequestrar radicais livres e, portanto, com indícios para aplicabilidade em uso terapêutico a ser investigado (Torres et al., 2018; Ribeiro et al., 2020). Possui ação antirreumática, anti-hemorrágica, anti-inflamatória, antimicrobiana, expectorante, homeostática e cicatrizante (Matos, 2002).

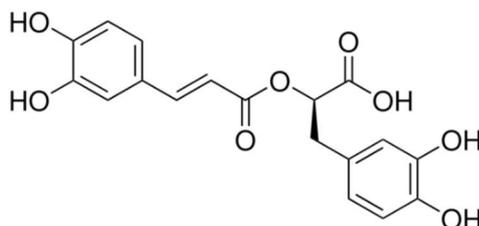
Por outro lado, adotando a perspectiva de moléculas refinadas oriundas de espécies vegetais já sob investigação farmacológica para uso terapêutico frente ao ofidismo botrópico temos os derivados do ácido caféico: Ácido Rosmarínico e Ácido Clorogênico.

Derivados do ácido caféico:

Ácido rosmarínico:

O ácido rosmarínico (AR) (**FIGURA 6**) é um composto fenólico resultante da esterificação do ácido cafeico e do ácido 3,4-diidroxifenilático, geralmente encontrado nas plantas da família Lamiaceae (da Silva et al., 2022).

Figura 6: Desenho molecular do ácido rosmarínico



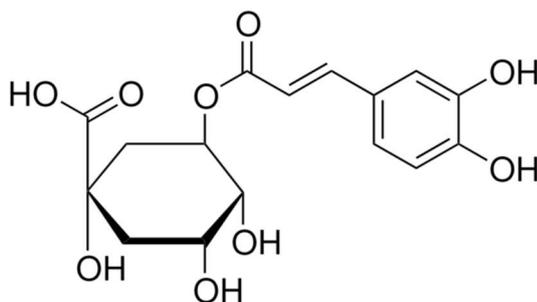
Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com>

Alguns estudos relataram diferentes atividades biológicas como propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticoagulantes (Salama; Abdel-Aty; Fahmy, 2018; Salvador et al,2019). Apesar de estudos preliminares descreverem o potencial antiofídico promissor do AR, seu efeito neutralizante contra peçonhas botrópicas ainda é escasso na perspectiva fisiológica e molecular. Amparado por investigações desenvolvidas por Salvador e colaboradores (2019), onde verificou-se a interação do AR com PLA₂MjTXII de *Bothrops moojeni*, em duas regiões distintas da molécula. Ademais, consoante ao demonstrado por da Silva e colaboradores, (2022) o AR também se mostra eficiente na neutralização das atividades enzimáticas *in vitro* da peçonha da serpente *Bothrops leucurus* por ligar às PLA₂s constitutivas dessas toxinas e, assim, atenuar sua atividade.

Ácido clorogênico

O ácido clorogênico (AC) (**FIGURA 7**) é um polifenol com função ácida resultante da esterificação do ácido cafeico com o ácido quínico, é frequentemente consumido através da alimentação, pois é abundante em alimentos como café e chá (Naveed et al, 2018).

Figura 7: Desenho molecular do ácido clorogênico



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com>

Evidências acumuladas indicam que a AC apresenta efeitos terapêuticos em sintomas que se assemelham aos observados em envenenamentos, como inflamação, dor e distúrbios de coagulação (Feng et al., 2016). Recentemente, o ácido clorogênico demonstrou eficácia na neutralização *in vitro* da peçonha de *B. leucurus* por ser capaz de se ligar às PLA₂s presentes na toxina e, assim, diminuir sua atividade (Trento et al., 2019). Segundo da Silva e colaboradores (2022), esse mecanismo envolve o bloqueio do canal hidrofóbico da proteína pelo ligante, impedindo que os fosfolípidios interajam adequadamente com ela e, conseqüentemente, bloqueando as alterações alostéricas necessárias para a exposição de sítios de ancoragem e ruptura na superfície da membrana, prejudicando a ação enzimática. Essas evidências tornam o AC um candidato promissor para investigar as propriedades terapêuticas.

Portanto, sendo aspecto de interesse na investigação deste projeto quanto a inibição das atividades hemorrágicas típicas do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. Destarte, diante de tais perspectivas alusivas à saúde pública, pretende-se investigar as interações que ocorrem entre os compostos de origem vegetal e a peçonha de *B. erythromelas* mediante plasma sanguíneo humano em condições compatíveis aos naturais e, por conseguinte, indicar os impactos de cada um dos extratos estudados no tempo de coagulação em um quadro de intoxicação por peçonha de *B. erythromelas*. Em adição a estes dados também se almejou observar a capacidade de inibição da atividade hialuronidásica como um indicador de potencial anti-inflamatório dos produtos vegetais em relação a peçonha.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade neutralizante de extratos vegetais e de dois compostos conhecidamente antiofídicos frente às atividades hemorrágica e hialuronidásica *in vitro* deflagradas pela peçonha da serpente *Bothrops erythromelas*

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade do extrato das espécies vegetais *C. quercifolius* e *D. emetocathartica* na inibição da atividade hemorrágica da peçonha de *B. erythromelas*;
- Avaliar a capacidade dos ácidos clorogênico e rosmarínico em inibir as atividades hemorrágica da peçonha de *B. erythromelas*;
- Determinar o potencial do extrato aquoso das espécies vegetais *C. quercifolius* e *D. emetocathartica* na inibição das atividades hialuronidásica da peçonha de *B. erythromelas*;
- Determinar o potencial dos ácidos clorogênico e rosmarínico em inibir as atividades hialuronidásica da peçonha de *B. erythromelas*.

3. RESULTADOS (Artigo)

POTENCIAL ANTICOAGULANTE E ANTI-HIALURONIDASE DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS CONTRA A PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas*

Rayane Gabrielle Brasil de Vasconcelos¹; Arthur de Oliveira Araújo²; Ellynes Amancio Correia Nunes³
Geovanna Maria de Medeiros Moura³; Genil Ferreira Dantas⁴; Diana Pontes da Silva³; Matheus de Freitas
Fernandes Pedrosa^{3,6}; Harley da Silva Alves^{2,4}; Ludovico Migliolo^{1,3,5}; Karla Patrícia de Oliveira Luna^{1,7,8}

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular- Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, Paraíba, Brasil.

² Departamento de Farmácia, Bacharelado em Farmácia Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.;

³ Departamento de Bioquímica Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte. Brasil.

⁴ Departamento de Farmácia Programa de pós graduação em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba. Brasil.

⁵ Departamento de Biotecnologia Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁶ Departamento de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte.

⁷ Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

⁸ Departamento de Pós-Graduação em Ensino de Ciências e Matemática, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Periódico: Revista Etnobiologia

3.1 RESUMO: O ofidismo, é um problema sério de saúde pública nos trópicos, indo além da mortalidade para incluir sequelas graves que afetam significativamente a qualidade de vida das vítimas. Embora *Bothrops erythromelas* seja a principal responsável por acidentes ofídicos na caatinga, é preocupante que essa espécie não esteja incluída no pool usado na produção do soro antiofídico. Dada a limitação do soro antiofídico, muitos estudos têm se concentrado em desenvolver tratamentos complementares para o ofidismo, e as plantas têm sido reconhecidas como uma fonte importante de compostos bioativos nesse contexto. Nesse sentido, foram avaliadas a capacidade de extratos brutos de *Doyerea emetocathartica*, *Cnidoscopus quercifolius* e dos ácidos rosmarínico e clorogênico em inibir a atividade hemorrágica e hialuronidásica da peçonha de *Bothrops erythromelas*. Inicialmente, foram utilizadas as metodologias de Tempo de Protrombina e Tromboplastina Parcial Ativada para avaliar a integridade da cascata de coagulação *in vitro*. Em seguida, o método turbidimétrico foi empregado para avaliar a preservação do ácido hialurônico *in vitro*. Os resultados mostraram atividade de inibição significativa em todas as concentrações na redução do tempo de protrombina com os extratos de *Doyerea emetocathartica* e *Cnidoscopus quercifolius* (93,3% e 94,01%), assim como com os ácidos rosmarínico e clorogênico (94,5% e 94,01%). Além disso, houve uma eficácia notável na redução do tempo de Tromboplastina Parcial Ativada com esses compostos, atingindo em *Doyerea emetocathartica* e *Cnidoscopus quercifolius* (95,16% e 95,14%) e ácido rosmarínico e clorogênico (96,02% e 95,52%). Quanto ao potencial anti-hialuronidásico, os compostos de origem vegetal também foram capazes de manter a integridade do substrato, *Doyerea emetocathartica* e *Cnidoscopus quercifolius* (2.811 ABS e 1.819 ABS) e ácido rosmarínico e clorogênico (0.5 ABS e 1.57 ABS). Esses resultados sugerem que os extratos estudados são promissores como tratamento adjuvante para acidentes ofídicos por *Bothrops erythromelas*, e também indicam um potencial para pesquisas futuras no desenvolvimento independente de medicamentos anti-hemorrágicos e com potencial anti-inflamatório.

Palavras-chave: Etnobotânica, toxina, jararaca, atividade anti-hemorrágica, atividade anti-inflamatória.

3.2 ABSTRACT: Snakebite is a serious public health problem in the tropics, going beyond mortality to include serious consequences that significantly affect the quality of life of victims. Although *Bothrops erythromelas* is the main responsible for snakebites in the caatinga, it is worrying that this species is not included in the pool used in the production of antivenom. Given the limitations of antivenom, many studies have focused on developing complementary treatments for snakebite, and plants have been recognized as an important source of bioactive compounds in this context. In this sense, the ability of crude extracts of *Doyerea emetocathartica*, *Cnidoscopus quercifolius* and rosmarinic and chlorogenic acids to inhibit the hemorrhagic and hyaluronidase activity of *Bothrops erythromelas* venom was evaluated. Initially, the Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin methodologies were used to evaluate the integrity of the in vitro coagulation cascade. Then, the turbidimetric method was used to evaluate the preservation of hyaluronic acid in vitro. The results showed significant inhibition activity at all concentrations in reducing prothrombin time with extracts of *Doyerea emetocathartica* and *Cnidoscopus quercifolius* (93.3% and 94.01%), as well as with rosmarinic and chlorogenic acids (94.5% and 94.01%). Furthermore, there was notable efficacy in reducing Activated Partial Thromboplastin time with these compounds, reaching *Doyerea emetocathartica* and *Cnidoscopus quercifolius* (95.16% and 95.14%) and rosmarinic and chlorogenic acid (96.02% and 95.52%). As for the anti-hyaluronidase potential, compounds of plant origin were also able to maintain the integrity of the substrate *Doyerea emetocathartica* and *Cnidoscopus quercifolius* (2,811 ABS and 1,819 ABS) and rosmarinic and chlorogenic acid (0.5 ABS and 1.57 ABS). These results suggest that the extracts studied are promising as an adjuvant treatment for snakebites caused by *Bothrops erythromelas*, and also indicate a potential for future research in the independent development of anti-hemorrhagic drugs with anti-inflammatory potential.

Keywords: Ethnobotany, toxin, jararaca, anti-hemorrhagic activity, anti-inflammatory activity.

3.3. INTRODUÇÃO:

A notificação expressiva de acidentes ofídicos tem sido historicamente documentada de forma irrealista pelo sistema nacional de saúde. Este panorama reflete uma realidade de subnotificação e desinformação generalizada, de forma que é possível observar relatos com número divergente de acidentes reportados aos prospectados pela comunidade científica. Portanto, informações divergentes têm impacto agravante na eficácia da resposta ao tratamento. Ainda neste tema, devido aos significativos impactos nocivos do ofidismo, desde 2009, tais acidentes são classificados como doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2023) (DNT) (Féliz-Silva; Silva-Junior; Zuculotto, 2017). Além disso, representam acidentes graves que causam mais de 40.000 (quarenta mil) mutilações anuais, e variam de 25.000 (vinte e cinco mil) a 125.000 (cento e vinte e cinco mil) casos que evoluem para óbito (Gomez-Betancur et al., 2019; Dal Belo et al., 2013). Ressalta-se também que a maior taxa de mortalidade é relatada na região Nordeste brasileira, devido a fatores como: favorecimento climático e geográfico; os altos índices de trabalho na área; e dificuldades de acesso à assistência médica (Santos; Maciel, 2022).

Incidentes ofídicos envolvendo espécies do gênero *Bothrops* podem ser considerados graves dependendo da evolução do perfil fisiopatológico. Essas alterações são caracterizadas por acentuada resposta inflamatória, lesão muscular (miotoxicidade), inchaço, sangramento e dor intensa. Estes efeitos acabam por levar à redução do fornecimento de sangue (isquemia) e à compressão dos nervos, e por decorrência, danos aos tecidos adjacentes. Em casos extremos, suficientemente graves pode levar à amputação ou mesmo evoluir a óbito. Nesse contexto, pesquisas forneceram evidências preliminares de que os soros antiofídicos utilizados, no Brasil, podem não neutralizar totalmente os efeitos tóxicos de todos os tipos de peçonha botrópicas. Isto implica na necessidade de explorar abordagens alternativas para aliviar as consequências prejudiciais dos incidentes envolvendo serpentes no Brasil (Féliz-Silva; Silva-Junior; Zuculotto, 2017).

Em particular, a espécie *B. erythromelas*, endêmica da Caatinga é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos na região Nordeste, sobre a qual não podemos nos olvidar que se trata da segunda região com maior número de notificações de mortalidade por acidentes ofídicos no Brasil (Bôto, 2016). Este dado mostra uma realidade preocupante principalmente quando se associa o número de acidentes à ausência de representantes da espécie *B. erythromelas*, no *pool* de peçonhas utilizadas na fabricação do soro antibotrópico. Como reflexo

da ausência desta espécie no soro comercial, pode-se listar ainda a existência de enzimas nesta peçonha cuja neutralização pelo soro antibotrópico é ineficiente, em especial nas porções proteicas relacionadas a Crisps, lectinas tipo C e serino-peptidases e peptídeos similares à trombina (Nunes et al., 2019).

Uma das características mais marcantes das toxinas de *B. erythromelas* consiste em efeitos locais acentuados, o que tem como consequência resulta em alta atividade coagulante em comparação com outras espécies do gênero *Bothrops*. Além disso, estas toxinas não apresentam ação semelhante à trombina (serina peptidases que atuam diretamente na molécula de fibrinogênio, convertendo-a em fibrina), o que, portanto, resulta em graves efeitos adversos na hemostasia (Silva, 2018). A peçonha induz alterações hemostáticas que envolvem hipercoagulabilidade sanguínea, seguida de incoagulabilidade sanguínea, na qual a análise histológica revela um quadro hemorrágico sistêmico, por isso, afeta principalmente pulmões, rins e fígado (da Silva, 2022; Bôto, 2016).

A atividade coagulante presente na peçonha de *B. erythromelas* é atribuída à presença de toxinas pró-coagulantes, ativadores dos fatores II (Protrombina) e X estimuladores que levam à formação de trombina endógena, o que resulta em um quadro de coagulação intravascular disseminada (Silva, 2018), seguido de quadro de hemorragia de consumo (Bôto, 2016).

Além dos efeitos hemostáticos, outro distúrbio local resultante da ação da toxina de *B. erythromelas* é decorrente da resposta inflamatória. Uma das vias mais comuns da resposta inflamatória é a permeabilização da matriz extracelular para distribuição local da toxina pela ação das hialuronidases da peçonha da serpente (Boldrini-França et al., 2017). Essa reação se desenrola em uma cascata, que envolve a síntese e liberação de diversos mediadores, bem como a ativação de células imunes residentes, além da infiltração de leucócitos e macrófagos em resposta a substâncias quimiotáticas liberadas no tecido lesionado (Gutiérrez et al., 2018; Gutiérrez; Lomonte, 1989; Mamede et al., 2020).

Enquanto isso, paralelamente, os produtos vegetais constituem uma fonte potencial químico estrutural e molecular, único e amplamente explorado pela medicina tradicional nas mais diversas culturas de todos os continentes do mundo. Essas práticas têm sido estudadas, o que em muitos casos corrobora e aprimora esse potencial através da tecnologia farmacológica no tratamento dos sintomas, bem como dos efeitos sistêmicos e locais causados por agentes químicos e biológicos adversos. Portanto, a percepção da diversidade vegetal privilegiada no Brasil, que compreende cerca de 23% das espécies vegetais identificadas no planeta, destaca a

competência da flora local na busca de soluções naturais para os mais diversos tipos de doenças (Fontana et al., 2021).

Acidentes causados por serpentes peçonhentas são responsáveis por um número excessivo de casos graves, que estão ligados a sequelas e mortes (WHO, 2023; Gomez-Betancur et al., 2019; Dal Belo et al., 2013). Uma parcela relevante das complicações se deve a dificuldades logísticas na aplicação do tratamento adequado em tempo hábil (Nunes et al., 2019). No entanto, a riqueza de plantas com potencial farmacológico, por ser um campo ainda pouco explorado, é um dado que evidencia a iminência da busca por alternativas mais acessíveis e de fácil distribuição, que possam ser combinadas com soro antiofídico para atenuar os sintomas dos acidentes e suas sequelas (Silva, 2018, da Silva, 2022; Fontana et al., 2021).

Cnidosculus quercifolius (Euphorbiaceae), conhecida popularmente como faveleira, é uma espécie endêmica no Brasil, amplamente utilizada no forrageamento bovino (Maia, 2004). O óleo de faveleira é utilizado no tratamento informal de dermatites; enquanto a casca interna do caule é utilizada no tratamento de inflamações ovarianas, hemorragias e muitos outros problemas de saúde (Maia, 2004, Torres et al., 2018).

As vias que sustentam a possível eficácia da espécie são baseadas na literatura, na qual o potencial antioxidante dos extratos de *C. quercifolius* mostraram a presença de 9 metabólitos capazes de eliminar radicais livres (Torres et al., 2018; Ribeiro et al., 2021).

Por sua vez, a espécie *Doyerea ementocathartica* (Cucurbitaceae), conhecida como batata de teiú, é uma espécie endêmica do Brasil, amplamente distribuída na região Nordeste (Lima., 2010). A raiz tuberosa de *D. ementocathartica* é utilizado pela população como ‘purificador do sangue’, com a finalidade de tratar manchas na pele e coceira, bem como para cessar dores nas costas (Roque; Rocha; Loiola, 2010; Silva, 2018).

O uso de *D. ementocathartica*. na medicina tradicional (Silvestre et al., 2021) demanda interesse na investigação desta espécie, quanto à presença de moléculas com atividades biológicas. Ainda, o uso popular e a presença de proteínas (lectinas), dotadas de ação inseticida e antimicrobiana em *Myracrodruon urundeuva*, outra espécie endêmica do domínio morfoclimático da caatinga com potencial farmacológico, denotam a importância de avaliar a segurança do uso de preparações bioativas em humanos, o que justifica a investigação de seu efeito nas células (Silvestre et al., 2021; Videres, 2017).

Dentre as substâncias derivadas de plantas com potencial antioxidante estão os compostos fenólicos, abundantes na flora local, assim como nas espécies vegetais sob investigação. Os compostos fenólicos são classificados em fenóis simples, ácidos fenólicos, derivados do ácido hidrocínâmico e flavonóides. A maioria dos ácidos hidrocínâmicos profusos

e seus principais representantes são os ácidos salicílico, p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico. Os ligantes são derivados glicosilados dos ésteres dos ácidos quínico, chiquímico e tartárico. E o ácido clorogênico como produto dos ácidos cafeico e quínico, conhecidos pelo seu potencial terapêutico no alívio do estresse oxidativo (Torres et al., 2018; Ribeiro et al., 2021; Videres, 2017).

Assim, diante de tais perspectivas alusivas à saúde pública, procurou-se investigar as interações que ocorrem entre compostos de origem vegetal e a peçonha de *B. erythromelas*. E, portanto, indicar também os impactos de cada um dos extratos estudados no tempo de coagulação, e no desenvolvimento inflamatório em casos de ofidismo por *B. erythromelas*. Logo, a importância desta pesquisa baseia-se na perspectiva de aplicabilidade de compostos vegetais de interesse na área farmacêutica com interesse na terapia antiofídica.

Além disso, dois ácidos clorogênico e rosmarínico, compostos isolados de extratos vegetais, conhecidos por exercerem atividade antiofídica, também foram testados contra as atividades hemorrágica e inflamatória *in vitro* desencadeadas pela peçonha da serpente *B. erythromelas*.

3.4. MÉTODOS:

3.4.1. Obtenção de materiais:

3.4.1.1. Obtenção e quantificação de peçonha bruta:

A peçonha de *B. erythromelas* adultas e criadas em cativeiro foi obtido em parceria com o Museu Vivo Répteis da Caatinga, Paraíba, Brasil, por extração manual. Foi refrigerado a -20 °C e liofilizado para uso futuro. A quantificação proteica foi expressa pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina como padrão. Além disso, o projeto está registrado no SISGEN sob o número de registro A590C61.

3.4.1.2. Plasma humano

Após apresentação de termo de consentimento livre e esclarecido, aprovação para obtenção e utilização do material foi fornecido pelo Comitê de Ética da Universidade Católica Dom Bosco sob o número (79.117-900). Cerca de 5 mL de sangue venoso foram coletados de indivíduos adultos saudáveis, do sexo masculino. Posteriormente, a coleta do sangue, o material foi centrifugado (800 rpm por 10 min) e os sobrenadantes (plasma) foram reservados em pool de 3 voluntários diferentes, sendo armazenados a -20 °C até o momento da utilização.

3.4.1.3.Extratos vegetais

A coleta e preparação dos extratos vegetais brutos foram realizadas em colaboração com a equipe do Laboratório de Fitoquímica, departamento de Farmácia (Centro de Ciências Biológicas e Saúde da Universidade Estadual da Paraíba).

3.4.1.3.1. Cnidoscylus quercifolius

A coleta foi realizada no mês de maio de 2022, direcionadas as partes aéreas de indivíduos adultos de *C. quercifolius*. Os indivíduos foram extraídos na área da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB (7°12'35.2"S 35°54'53.1"W).

O processo de secagem das folhas ocorreu em estufa a 40 °C por cerca de 96 horas. Em seguida, foi armazenado em frasco âmbar até o uso.

A extração com etanol 96% ocorreu pelo processo de maceração exaustiva renovado a cada período de 72 horas. O extrato obtido foi submetido a um processo de rotoevaporação em temperatura inferior a 50 °C para eliminação do solvente, obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB) e acondicionados a -2 °C até o uso.

3.4.1.3.2. Doyerea ementocathartica

As coletas das partes aéreas de indivíduos adultos de *D. ementocathartica*, foi realizada em outubro de 2022, em propriedade privada, no município de Barra de Santana, PB (7°30'12.4"S 35°57'39.8"W).

Para o processo de secagem, o procedimento é semelhante ao mencionado acima: as raízes foram desidratadas em estufa à temperatura de 40 °C até a estabilização da umidade. Após a secagem, o material foi triturado em moinho rotativo vertical e armazenado em frasco âmbar até o procedimento subsequente.

Para obtenção do extrato hidroalcoólico de *D. ementocathartica*, 50 g do pó obtido da moagem foram solubilizados em 350 mL de mistura hidroalcoólica (90%), na qual foi submetido à extração por maceração por 72 horas, e filtrado para obtenção do extrato aquoso.

3.4.1.3.3. Compostos purificados

Os compostos fenólicos, ácido clorogênico (pureza $\geq 95\%$) e ácido rosmarínico (pureza $\geq 97\%$), adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.4.2. Atividade pró-coagulante

Os procedimentos foram realizados conforme descrito por Theakston e Reid (1983), com pequenas modificações. Inicialmente para descongelar o plasma, alíquotas de 100 μL foram mantidas a 37 °C por 5 minutos.

3.4.2.1. Tempo de Protrombina (TP)

O tempo de coagulação plasmática foi medido por meio de um coagulômetro digital (Laser Sensor Clotimer, CLOT, São Paulo, SP, Brasil).

Para inibição da atividade de coagulação, uma dose mínima coagulante da peçonha de *B. erythromelas*. (1 μL) foi empregado e o ensaio conduzido conforme descrito acima, exceto pela pré-incubação por 30 minutos a 37 °C da peçonha com os extratos de *D. ementocathartica* e *C. quercifólius* (1:0,5; 1:1; 1:2; 1: 5; 1:7,5; p/p). Os AC e AR em diferentes proporções (1:1, 1:2,5, 1:5 e 1:10, p/p).

A peçonha (pré-incubada apenas com PBS, na ausência de agentes inibidores) foi utilizado como controle positivo.

Os resultados foram expressos em segundos (s) como média \pm erro padrão da média.

3.4.2.2. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)

O tempo de coagulação plasmática foi medido por meio de um coagulômetro digital (Laser Sensor Clotimer, CLOT, São Paulo, SP, Brasil).

Para inibição da atividade de coagulação, uma dose de coagulação da peçonha de *B. erythromelas* (1 μL) foi manipulado e o ensaio conduzido conforme descrito acima, exceto pela pré-incubação por 30 minutos a 37 °C da peçonha com *D. ementocathartica* e *C. quercifólius* (1:0,5; 1:1; 1:2; 1: 5; 1:7,5; p/p) e AC ou AR em diferentes proporções (1:0,5 e 1:1, p/p).

A peçonha (pré-incubada apenas com PBS, na ausência de agentes inibidores) foi utilizado como controle positivo.

Os resultados foram expressos em segundos (s) como média \pm erro padrão da média.

3.4.3. Inibição da atividade hialuronidásica

A atividade de inibição da hialuronidase foi determinada pelo método turbidimétrico utilizando ácido hialurônico como substrato, conforme descrito anteriormente, com adaptações (Féliz-Silva; Silva-Junior; Zuculotto, 2017; Paixão-Cavalcante et al., 2015).

Diferentes concentrações da peçonha (0,12; 0,25; 0,5 e 1 µg) foram diluídas em PBS e pré-incubadas, com tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo NaCl 0,15 M para um volume final de 80 µL por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de solução de ácido hialurônico (0,5 µg. µL⁻¹ em tampão acetato) e as amostras foram incubadas por 1 hora a 37 °C.

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 200 µL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 2,5% em hidróxido de sódio a 2%. Após 10 minutos de repouso à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 405 nm, em leitor de microplacas (Epoch-BioTek, Winooski, VT, EUA). Os brancos foram preparados da mesma forma, apenas, substituindo o substrato por igual volume de tampão.

Para os ensaios de inibição foi utilizada a concentração de maior atividade hialuronidase da peçonha (1 µg), que foi pré-incubada com as seguintes proporções crescentes dos extratos brutos de *D. ementocathartica* e *C. quercifólius* (1:0,5; 1:1; 1:2; 1: 5; 1:7,5; p/p) peçonha: *D. ementocathartica* e *C. quercifólius* p/p) a 37 °C por 30 minutos.

Por sua vez, nos testes de inibição ácida, as proporções crescentes utilizadas foram AR (1:0,5; 1:1 p/p,) peçonha: / AC ou AR, a 37 °C por 30 minutos, e em seguida o teste foi realizado como anteriormente descrito.

Os resultados foram expressos em absorbância, para avaliar a integridade do ácido hialurônico frente às hialuronidases da peçonha associadas aos derivados vegetais em relação ao controle.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Atividade pró-coagulante

O consenso científico e epidemiológico relata a ocorrência de distúrbios hemostáticos derivados de acidentes ofídicos, que incluem a coagulopatia de consumo induzida pela peçonha de *B. erythromelas* (Suhita et al., 2022). Embora, essa peçonha não apresente atividade semelhante à trombina, está consolidada a descrição de intenso efeito pró-coagulante e atividade da berytrativase, que se configura como ativador do fator X da cascata de coagulação (Bôto, 2016; Silva, 2018).

Ao considerar tais efeitos, a soroterapia é essencial para atenuar os distúrbios sistêmicos relacionados à mortalidade, porém, ainda carece de eficiência na reversão do comprometimento local, levando à permanência de sequelas em longo prazo (Boechat et al., 2001; Lima et al., 2022). Além disso, em casos atípicos, são necessárias doses adicionais de soro antiofídico (SAB) para conter a evolução dos quadros de incoagulabilidade (Sajevic; Leoardi; Kri, 2011). Portanto, além da terapia antiofídica botrópica para o tratamento de acidentes ofídicos, ainda é desejável o desenvolvimento de tratamentos adjuvantes, com o objetivo de complementar as deficiências apresentadas pela SAB, principalmente, no que diz respeito aos distúrbios hemostáticos associados à mordedura de *B. erythromelas* (Féliz-Silva; Silva Junior; Zuculotto, 2017).

Contudo, é importante ressaltar que o foco inicial da presente pesquisa se lastreia na incoagulabilidade sanguínea e inflamação local desencadeados por acidentes botrópicos. No que se refere ao quadro de coagulopatia local de consumo, é um efeito resultante da ativação contínua dos fatores da cascata de coagulação por toxinas, que levam à depleção plasmática. As classes de toxinas associadas a esses efeitos são as serinopeptidases da peçonha de serpente (SVSPs) e as metalopeptidases da peçonha de serpente (SVMPS) com ação fibrinogenolítica (Slagboom et al., 2017; White, 2005; Paredes et al., 2016).

Extratos hidroalcoólicos da espécie vegetal *D. ementocathartica* e extratos metanólicos de *C. quercifolius* apresentaram efeitos neutralizantes, em particular, com ação anti-hemostática, anti-inflamatória e antitrombótica (Ribeiro; de Medeiros; da Silva-Chaves, 2020; Santos; da Silva; da Silva, 2020; Amoah et al., 2016; Videres, 2017; Silvestre et al., 2021) Por se tratarem de estudos de produtos ainda em estado bruto exigiram altas concentrações para avaliação da atividade. Enquanto que, os ácidos derivados do ácido cafeico (Ácido Rosmarínico e Ácido Clorogênico) demonstraram efeitos positivos *in vitro* e *in vivo* para ação coagulante, hemorrágica e edematogênica de *B. leucurus* (da Silva, 2022).

O potencial dos compostos contra a ação coagulante da peçonha foi medido por ensaios de TP e TTPa, monitorando o tempo decorrido desde a adição da peçonha até a formação do coágulo de fibrina. Para tanto, foram utilizadas diferentes concentrações dos compostos, após incubação com a peçonha em pool de plasma humano.

Os resultados mostraram que *D. ementocathartica* apresentou-se eficaz em atenuar o efeito hemorrágico das toxinas de *B. erythromelas* em todas as proporções testadas, de modo a exibir o melhor desempenho na concentração de 1:100, capaz de reduzir o tempo de coagulação em 1 minutos e 48 segundos (93,3%). Resultado semelhante foi observado com *C. quercifolius*, que manifestou atividade anticoagulante em todas as concentrações, com efeitos pronunciados

na concentração mais alta 1:200, reduzindo o tempo de coagulação em 1 minutos e 49 segundos (94,01%) (Figura 8. A; 1. B).

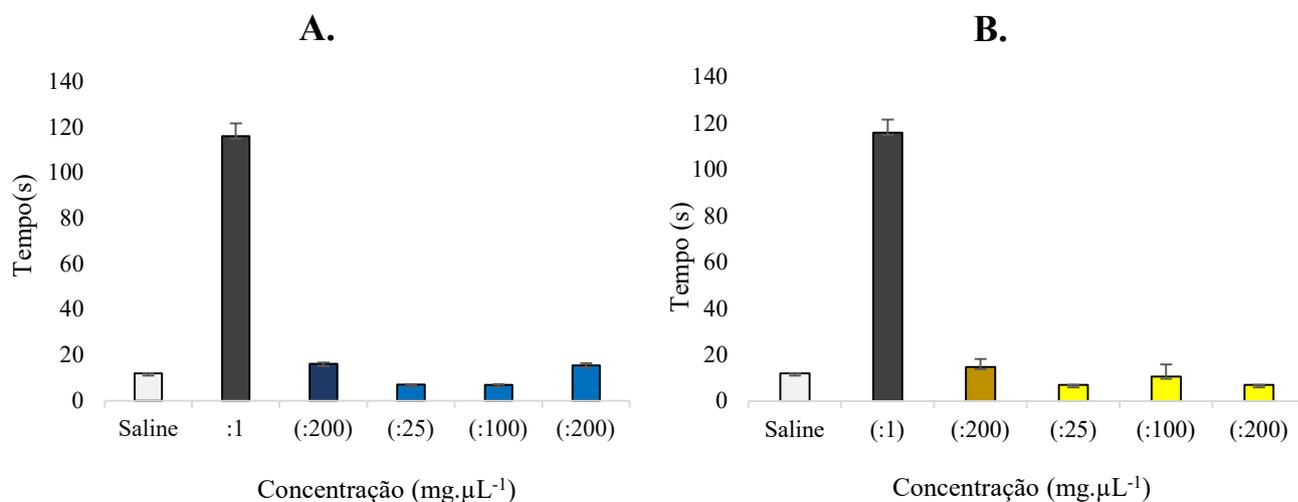


Figura 8: Tempo de protrombina (TP) do plasma humano frente a peçonha de *B. erythromelas* associado a candidatos a tratamento adjuvante de origem vegetal. (A) *Doyerea emetocathartica*. Legendas: Preto: Peçonha; Azul escuro: Extrato bruto (*D. emetocathartica*); Azul: Teste - Peçonha e extrato. (B) *Cnidoscylus quercifolius*. Legendas: Preto: Peçonha; Amarelo escuro: Extrato bruto (*C. quercifolius*); Amarelo: Teste - Peçonha e extrato.

Embora a alta complexidade da composição e fisiologia dos extratos brutos possa sugerir que muitas vias podem contribuir para o resultado *in vitro*, os resultados observados mostram a capacidade neutralizante sobre os efeitos hemostáticos no plasma humano dos extratos avaliados. Assim no futuro, eles podem constituir em importante produto farmacológico para conter esses efeitos em vítimas de acidentes ofídicos.

No entanto, podemos correlacionar esses resultados com os altos níveis de cálcio presentes nos extratos vegetais brutos, em torno de 2,18% da composição seca (Santos; da Silva; da Silva, 2020; Amoah et al., 2016). Isto porque, o cálcio é um componente indispensável na via de ativação de vários fatores de coagulação como transportador preferencial de íons para a energia necessária na via intrínseca, extrínseca e comum, mais proeminentemente como cofatores de ativação (Fernandes; Cardoso; Cavalcante, 2015).

Além disso, também em *C. quercifolius* foi identificada a presença de outros compostos derivados do ácido cafeico, como o ácido cinâmico, cujo esqueleto molecular e efeitos são semelhantes aos observados para os ácidos Rosmarínico e Clorogênico, com efeitos positivos em comparação aos efeitos já descritos da peçonha (Aung et al., 2010; da Silva, 2022).

A AR resultou em redução relevante do tempo de coagulação em todas as proporções, principalmente na maior concentração 1:2, diminuindo o tempo de coagulação em 1 minutos e 48 segundos (94,5%), e diminuindo conforme a redução das concentrações. O AC foi eficaz em

atenuar o efeito hemorrágico da peçonha em todas as proporções testadas, apresentando melhor desempenho na concentração 1:3, diminuindo em 1 minutos e 49 segundos (94,01%) o tempo de coagulação (Figura 9. A; 2. B).

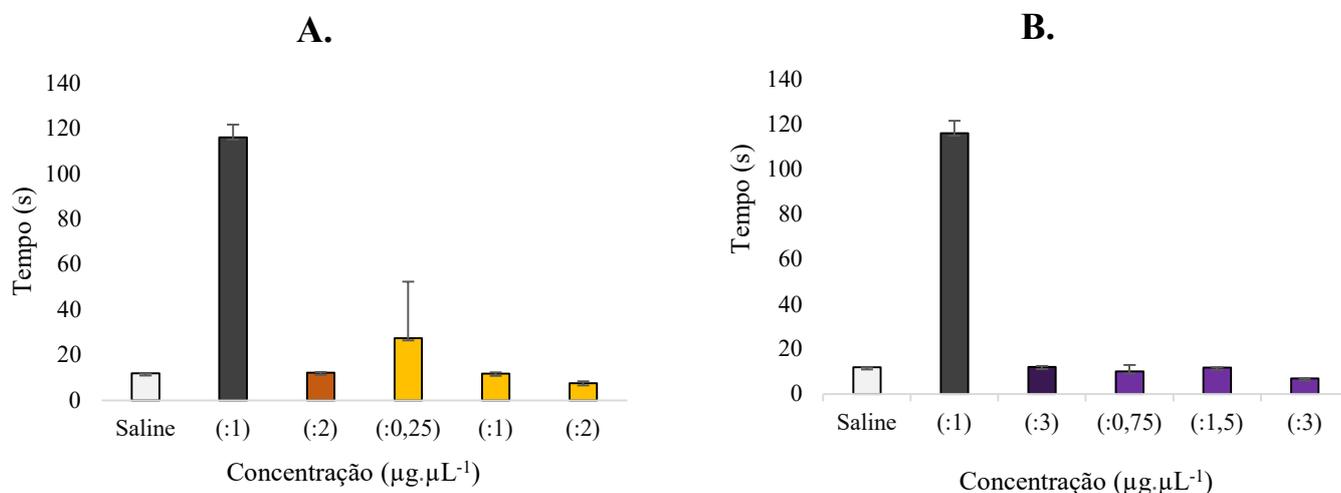


Figura 9: Tempo de protrombina (TP) do plasma humano contra peçonha de *B. erythromelas* associado a candidatas a tratamento adjuvante derivados de origem vegetal. (A) Ácido Rosmarínico (AR). Lendas: Preto: Peçonha; Laranja escuro: Ácido isolado (AR); Laranja: Teste - Peçonha e Ácido isolados. (B) Ácido Clorogênico (AC) Legendas: Preto: Peçonha; Roxo escuro: Ácido isolado (AC); Roxo: Teste - Peçonha e Ácido isolados.

A AR demonstrou particular eficiência na redução da hemorragia desencadeada especificamente em quadros ofídicos, com pesquisas relatando as peçonhas das serpentes *Trimeresus flavoviridis*, *Crotalus atrox*, *Gloydius blomhoffii*, *Bitis arientans*, *Protobothrops flavoviridis* e *B. leucurus* (Gil et al., 2013; da Silva, 2022). Esses dados corroboram com os achados do presente trabalho, não apenas referentes aos ácidos em si, mas também aos extratos vegetais brutos.

Diante de estudos anteriores com indivíduos da mesma família ofídica, foi possível observar a eficácia do ácido Rosmarínico, tendo em vista a degradação do fibrinogênio em acidentes provocados por espécies do gênero *Bothrops* (da Silva, 2022). Além disso, está descrito que a maioria das toxinas com atividade fibrinogenolítica pertence à classe das SVMP, com apenas uma pequena parcela da classe das SVSP (Naveed et al., 2018), o que torna plausível atribuir os efeitos observados à participação das SVMPs.

Tal atividade anti-hemorrágica também se deve à sua elevada atividade antioxidante. A presença de quatro hidrogênios fenólicos em combinação com as duas porções catecol confere a capacidade de modular a eliminação de radicais livres (Zn⁺). Investigações eletroquímicas

revelam a porção do ácido cafeico como determinante na oxidação deste composto (Gil et al., 2013), porção que também está presente no ácido clorogênico, que obteve resultados semelhantes apoiados pelos estudos de Naveed et al. (2018). O metabólito presente em *C. quercifolius* (ácido cinâmico) compartilha grande parte da porção do ácido cafeico responsável por este efeito (Fernandes; Cardoso; Cavalcante, 2015).

Considerando a diminuição do tempo de coagulação em concentrações mais elevadas, observa-se a possível interação entre os extratos utilizados tanto com a cascata natural de coagulação quanto com SVMPs de peçonha de serpente. Este efeito pode ser atribuído, entre outros fatores, à presença de compostos fenólicos e flavonóides antioxidantes (Féliz-Silva; Silva Junior; Zuculotto, 2017), que atua como agentes quelantes para reter íons metálicos livres essenciais na fisiologia biológica da atividade proteolítica de metalopeptidases de peçonha de serpente (Ca^{2+} e Zn^{2+}) (Jorge et al., 2015). Assim, o principal mecanismo inibitório conhecido está correlacionado ao bloqueio da distribuição de Zn^{2+} (Jorge et al., 2015). Este dado está de acordo com os resultados obtidos por da Silva et al. (2022) que, estudando a peçonha de *B. leucurus*, observou que AC e AR estabelecem ligações de hidrogênio através de seus grupos hidroxila e carboxila com resíduos His59, His63 e His69, responsáveis pela coordenação do zinco (da Silva, 2022).

Conforme descrito por Jorge et al. (2015), a peçonha de *B. erythromelas* causa um aumento significativo no tempo de tromboplastina parcial ativada quando comparado à solução salina. Em nossos resultados, foi possível observar o efeito atenuante de todos os extratos em todas as concentrações testadas no TTPa. Portanto, há redução no tempo de coagulação, mesmo em comparação ao controle, o que sugere a interação direta dos extratos testados com as proteínas presentes no plasma ao longo da cascata de coagulação de forma independente.

O TTPa avalia a integridade da cascata de coagulação mediada por fatores (II, VIII, IX, X, XI, XII) componentes da via intrínseca e comum da cascata de coagulação (Carlos; de Sousa, 2007), sendo esta via mais longa e, logo, particularmente dependente de Íons Ca^{2+} como cofatores de ativação para sua fisiologia geral, o que pode se refletir em sua sensibilidade à ação de extratos (Aung et al., 2010).

Os componentes químicos presentes nos metabólitos secundários das plantas (taninos, flavonóides, saponinas, esteróides e terpenóides) são capazes de inibir proteases de serpentes envolvidas na hemorragia. Seja por interação direta com SVMP's ou interferência na hemorragia através da cascata de coagulação onde aparecem como agentes quelantes de íons metálicos. Os ácidos isolados (AR e AC) interagem com as proteínas da serpente nos sítios de ligação do Zinco (da Silva et al., 2022), enquanto o observado com os extratos pode estar

relacionado à abundância de cálcio junto com derivados do ácido caféico, o que aumentaria o efeito antienvhecimento e capacidade hemorrágica das amostras no mecanismo sob ação da peçonha. Os ácidos hidroxicinâmicos presentes em ambas as espécies vegetais têm o ácido caféico como um dos seus principais compostos representativos. Os ácidos caféico e quínico, quando combinados, formam o ácido clorogênico (Torres et al., 2018; Videres, 2017).

Foi observada a eficácia de *D. ementocathartica* em atenuar o efeito hemorrágico da peçonhada *B. erythromelas* em todas as proporções testadas, exercendo seu efeito mais proeminente na concentração 1:200, o que impactou no tempo de coagulação com uma diminuição de 2 minutos e 50 segundos (95,16%). Enquanto *C. quercifolius* mostrou-se eficaz em atenuar o efeito hemorrágico da peçonha em todas as proporções testadas, com melhor performance na concentração 1:25, reduzindo o tempo de coagulação em 2 minutos e 50 segundos (95,14%) (Figura 10.A; 3.B).

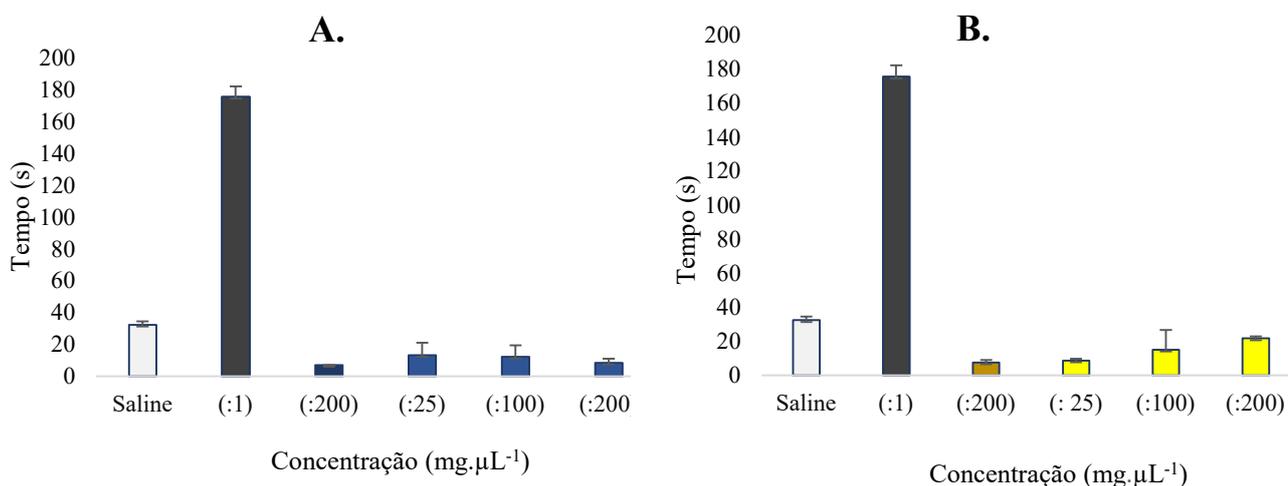


Figura 10: Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) do plasma humano frente a peçonha de *B. erythromelas* associado a candidatos a tratamento adjuvante de origem vegetal. (A) *Doyerea emetocathartica*: Legendas: Preto: Peçonha; Azul escuro: Extrato bruto (*D. emetocathartica*); Azul: Teste - Peçonha e extrato. (B) *Cnidoscylus quercifolius*: Legendas: Preto: Peçonha; Amarelo escuro: Extrato bruto (*C. quercifolius*); Amarelo: Teste - Peçonha e extrato.

O AR mostrou-se eficaz em atenuar o efeito hemorrágico da peçonha em todas as proporções testadas, de maneira a apresentar o melhor desempenho na concentração 1:1, reduzindo o tempo de coagulação em 2 minutos e 51 segundos (96,02%). Por outro lado, o CA mostrou-se eficaz em atenuar o efeito hemorrágico das toxinas de *B. erythromelas* em todas as proporções testadas, de maneira a comportar-se melhor na concentração 1:3, ao subtrair 2 minutos e 52 segundos (95,52%) da coagulação. (Figura 11.A; 4.B)

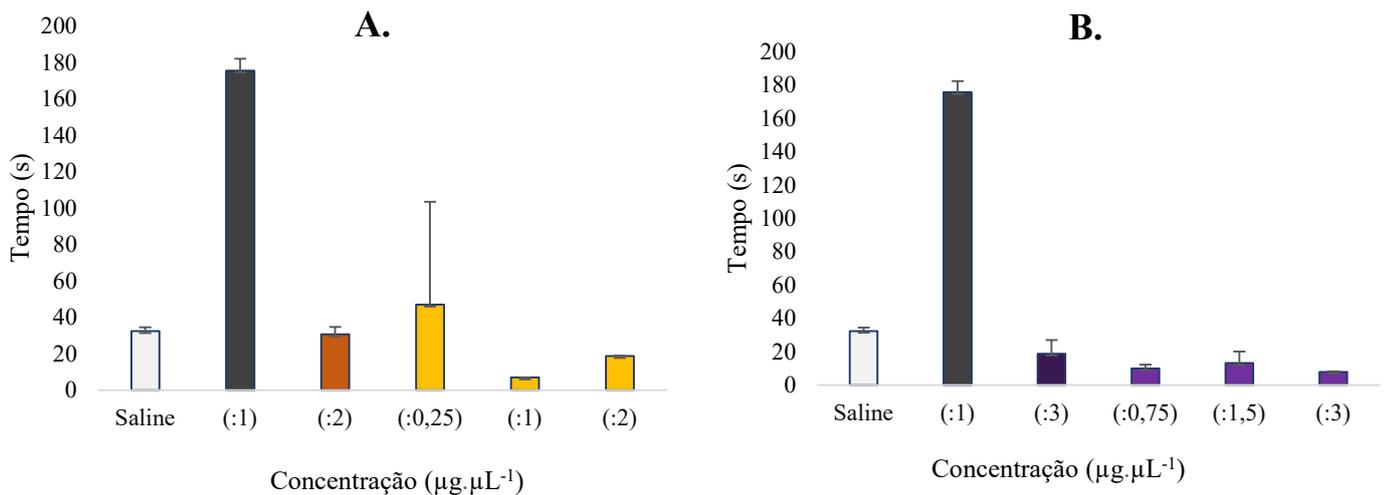


Figura 11: Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) do plasma humano frente a peçonha de *B. erythromelas* associado a candidatos a tratamento adjuvante derivados de origem vegetal. (A) Ácido Rosmarínico (AR). Lendas: Preto: Peçonha; Laranja escuro: Ácido isolado (AR); Laranja: Teste - Peçonha e Ácido isolados. (B) Ácido Clorogênico (AC) Legendas: Preto: Peçonha; Roxo escuro: Ácido isolado (AC); Roxo: Teste - Peçonha e Ácido isolados.

A coagulação é um processo complexo, dependente de íons de cálcio e de uma infinidade de enzimas liberadas no tecido danificado para completar a cascata (Swenson; Markland, 2005). Em muitos casos, a ausência ou ineficácia de qualquer um desses fatores resultará em coagulação ineficiente, em casos específicos incoagulável, causando hemorragias locais como as observadas em acidentes causados por *B. erythromelas* (Bôto, 2016).

Tais dados, referentes ao ácido rosmarínico e clorogênico, estão de acordo com os dados encontrados por da Silva et al. (2022), porém as alterações acentuadas observadas no TP e no TTPa sugerem que, concentrações muito maiores de proteases com efeitos diretos na cascata de coagulação, encontrada na peçonhada *B. erythromelas* em relação a *B. leucurus*. Diferenciando-se de outros representantes do gênero por sua atividade “semelhante à trombina” (Bôto, 2016; Silva, 2018; da Silva, 2022).

Vale ressaltar que a já expressiva atividade fibrinogenolítica no sangue total exercida pela peçonha de *B. erythromelas*, quando isolada, esta toxina tende a se tornar ainda mais pronunciada (Jarifapour et al., 2021). Da Silva et al. (2022), em testes com a metodologia *in silico* do Gênero (*B. leucurus*), foi possível isolar e observar os fatores preponderantes, para investigar o mecanismo nos casos do ácido clorogênico e rosmarínico. No caso do presente estudo, pelos resultados obtidos há indícios de que há inativação de proteases como SVMP através da captura de Zn^+ em todas as substâncias testadas, bem como fortalecimento e aceleração da cascata de coagulação com a inserção de Ca^{2+} em casos específicos de extratos.

Portanto, é importante lembrar que todos os derivados do ácido cafeico (como AR e AC e metabólitos presentes em *D. ementocathartica* e *C. quercifolius*), além de uma infinidade de compostos fenólicos vegetais, contêm (OH) ou (COOH) em seu esqueleto molecular. Esses compostos possuem potencial antioxidante, já descrito (Amoah et al., 2016) e apoiado na literatura como eficazes propriedades anti-inflamatórias, antivirais, antitumorais, neuroprotetoras, cicatrizantes e antiofídicos (Paredes et al., 2016; Ribeiro; de Medeiros; da Silva-Chaves, 2020; Amoah et al., 2016)

Tanto o AC quanto o AR demonstram, em estudos anteriores, sua capacidade inibitória sobre os efeitos hemostáticos induzidos pelas peçonhas botrópicas (da Silva et al., 2022). O AC possui atividade anticoagulante *in vitro* através da interação com os fatores Xa, XIIIa e trombina, levando ao prolongamento do TC nas vias intrínseca, extrínseca e comum (Salama; Abdel-Aty; Fahmy, 2018).

A AR mostrou atividade inibitória na agregação plaquetária induzida por colágeno. Além disso, extratos aquosos das espécies *Rosmarinus officinalis* e *Thymus atlanticus*, ricos em AR, atenuaram a atividade fibrinogenolítica induzida pela peçonha de *Cerastes cerastes* e diminuíram o TC nos testes com TP e TTPa (Salama, Abdel-Aty, Fahmy, 2018). Assim, podemos reatestar a efetividade anticoagulante desses ácidos como agentes neutralizantes contra os efeitos hemorrágicos da peçonha de *B. erythromelas*.

Além disso, a capacidade inibitória de proteases da peçonha bruto, observada em nossos resultados, pode estar contribuindo para esse efeito, visto que as proteases da peçonha botrópica têm sido amplamente relacionadas aos efeitos hemostáticos observados nesse tipo de envenenamento (Swenson; Markland, 2005; Sousa et al., 2020).

As reduções no tempo de coagulação de alguns extratos em ambas as vias sugerem que, além de constituírem novos candidatos ao tratamento adjuvante de acidentes ofídicos com *B. erythromelas*, também podem ser promissores para pesquisas que visem o desenvolvimento de drogas anti-hemorrágicas de forma independente.

3.5.2. Inibição da atividade hialuronidásica

Foi possível observar que a peçonha de *B. erythromelas* apresenta atividade hialuronidase expressiva e dose-dependente, o que corrobora com estudos anteriores relacionados ao gênero (da Silva et al., 2022; Delgadillo et al., 2013; Sunitha et al., 2015).

Considerando a natureza inicial dos produtos ainda em estado bruto, como é o caso dos extratos em questão, foram necessárias altas concentrações para avaliar a atividade.

Nesse sentido, utilizando *D. ementocathartica* ou *C. quercifolius*, observou-se que houve redução da atividade da hialuronidásica contra a referida peçonha, exercida por aqueles extratos. O extrato hidroalcoólico de *D. ementocathartica* reduziu drasticamente o consumo do ácido hialurônico deflagrado pela toxina de *B. erythromelas*, ao atingir cerca de 2.811 ABS de inibição na proporção mais promissora (1:200), diminuindo a eficácia nas concentrações mais baixas (**Figura 12. A**).

O extrato metanólico de *C. quercifolius* também se mostrou promissor pelos resultados observados. O extrato exerceu degradação de aproximadamente 1.819 ABS na proporção do melhor desempenho testado (1:200), diminuindo a eficácia em concentrações mais baixas (**Figura 12. B**).

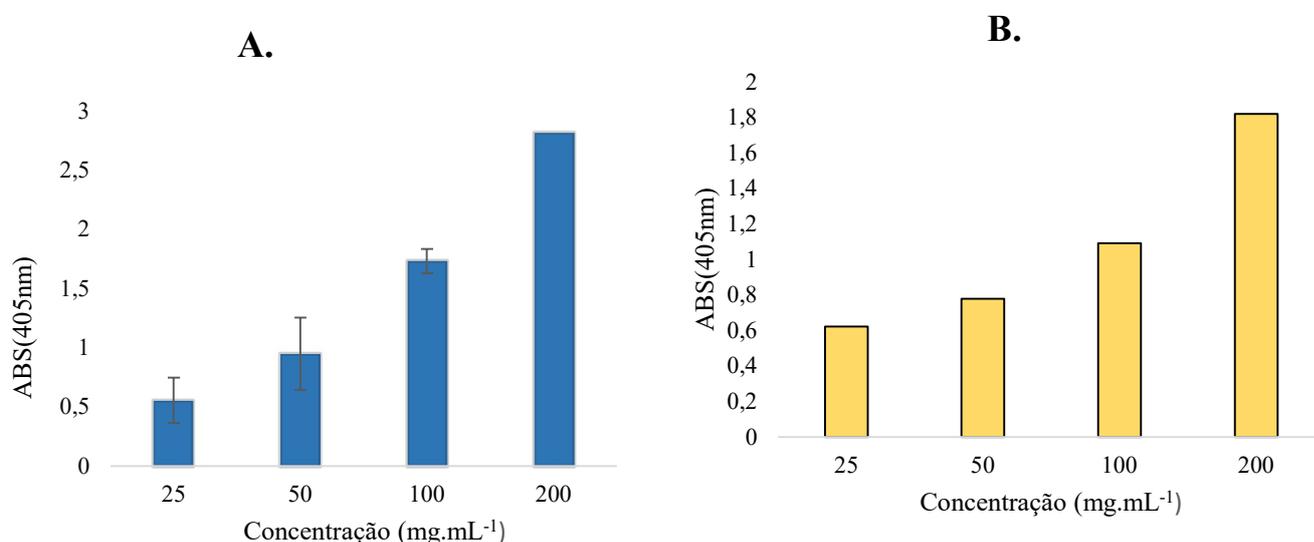


Figura 12. Avaliação do desempenho inibitório da degradação do ácido hialurônico causada pela peçonha de *B. erythromelas* em diferentes concentrações. (A) *Doyerea emetocathartica*, (B) *Cnidoscus quercifolius*.

Conforme mostrado acima, para os testes com AC e AR, houve redução significativa da atividade hialuronidásica, mais expressiva que os resultados apresentados por da Silva et al. (2022), com a peçonha de *B. leucurus*. Além disso, a atividade inibitória dos compostos vegetais brutos se mostrou favorável em todas as amostras analisadas.

AC reduziu significativamente o consumo de ácido hialurônico da peçonha de *B. erythromelas*, atingindo cerca de 1,57 de inibição de ABS nas três concentrações mais altas testadas (1:1), a eficácia caindo quase pela metade na concentração mais alta (1:0,5). O AR foi menos eficaz, inibindo a ação da hialuronidase desta toxina em 0,5 ABS na menor proporção testada (1:0,5) e atingindo 1 inibição de ABS na maior proporção testada (1:1) (**Figura 6. A; 7. B**).

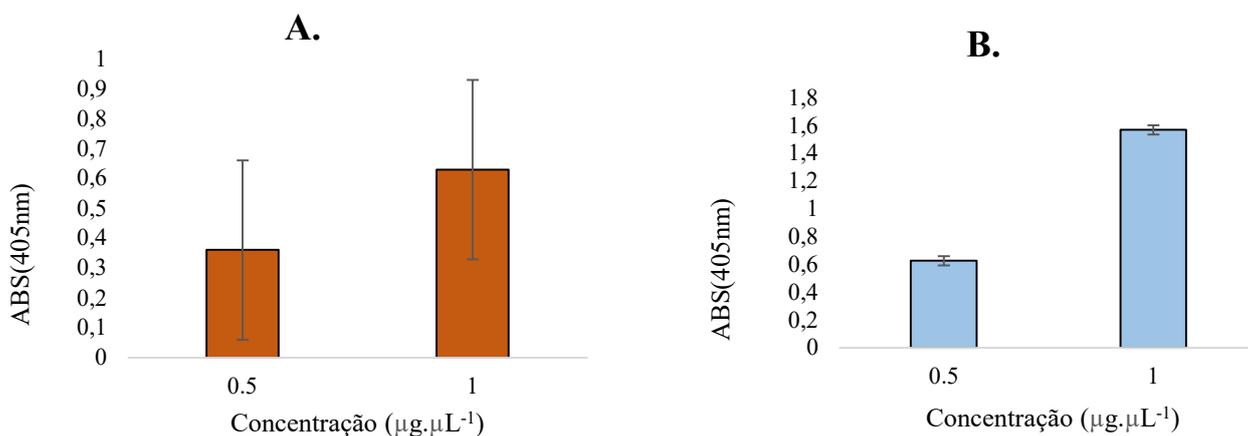


Figura 6: Avaliação do desempenho inibitório da degradação do ácido hialurônico causada pela peçonha de *B. erythromelas* em diferentes concentrações de ácidos derivados de produtos vegetais. (A) Ácido Rosmarínico, (B) Ácido Clorogênico.

O envenenamento botrópico tem em seu quadro sintomatológico o desenvolvimento de um intenso processo inflamatório no local da mordedura, caracterizado por edema, dor e recrutamento de células inflamatórias, esse processo é amplo e envolve outros componentes da peçonha bem como agentes do próprio organismo em resposta à agressão (Boldrini-França et al., 2017; França; Tamburigi, 2023). Entretanto, a maioria dos estudos limita-se à busca de evidências sobre SVMPs e PLAs nas atividades pró-inflamatórias das peçonhas. Ao mesmo tempo em que negligencia a participação de outras toxinas, como SVSPs e hialuronidases ofídicas que atuam nas cascatas inflamatórias plasmáticas (Teixeira et al., 2009).

Neste estudo os extratos de *C. quercifolius* e *D. ementocathartica* mostraram potencial para atuar como fontes anti-inflamatórias, uma vez que ambos neutralizaram significativamente a atividade hialuronidásica exercida pela peçonha de *B. erythromelas*. Fornece suporte para evidências etnobotânicas, que podem resultar em adjuvantes de fácil acesso às comunidades rurais onde o tratamento sorológico é aplicado tardiamente, a fim de mitigar sequelas permanentes nestes casos.

3.6. CONCLUSÕES:

De acordo com as condições estudadas, confirmou-se a hipótese inicial quanto ao potencial de fitoquímicos em estado bruto ou isolado frente a atividade inicial das toxinas de *B. erythromelas*, no que se refere a integridade da cascata de coagulação e do ácido hialurônico endotelial.

Foi constatada a eficácia superior à 92% de todos os extratos testados na inibição *in vitro* das atividades enzimáticas da peçonha de *B. erythromelas*, no que diz respeito à cascata de coagulação plasmática, sobressaindo-se entre eles o ácido rosmarínico.

Quanto à inibição do efeito inflamatório via ácido hialurônico, demonstrou eficácia na redução dos efeitos da peçonha de *B. erythromelas* em todos os extratos e produtos vegetais destacando-se em *D. emetocathartica* que atingiu absorvância de 2.811 (1:200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), e até 1,57 de absorvância no composto isolado AC (Ácido Clorogênico).

Ambos os extratos estudados apresentaram importante atividade neutralizante em aspectos da soroterapia, que tende a não responder ao dano tecidual local no envenenamento botrópico.

Esses extratos deverão ser analisados futuramente em relação aos acidentes ofídicos sob novas perspectivas, abordagens e metodologias, visando principalmente elucidar as substâncias envolvidas nos resultados positivos encontrados. Da mesma forma, também são desejáveis indicações de compostos de interesse no tratamento de doenças hemostáticas e inflamatórias.

3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOAHA, S.K.S; SANDJO, L.P; KRATZ, J.M; BIAVATTI, M.W. Rosmarinic acid—pharmaceutical and clinical aspects. **Planta medica**, v. 82, n. 05, p. 388-406, 2016.
- AUNG, H. T; NIKAI, T; KOMORI Y; NONOGAKI T; NIWA M; TAKAYA, Y. Biological and pathological studies of rosmarinic acid as an inhibitor of hemorrhagic *Trimeresurus flavoviridis* (habu) venom. **Toxins**, v. 2, n. 10, p. 2478-2489, 2010.
- BOECHAT, A. L. R; PAIVA C. S; FRANÇA, F.O; DOS-SANTOS, M.C. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 07-14, 2001.
- BOLDRINI-FRANÇA, J; COLOGNA, C.T; PUCCA, M.B; BORDON, K.C.F; AMORIM, F.G; ANJOLETTE, F.A.P; CORDEIRO, F.A; WIEZEL, G.A; CERNI, F.A; PINHEIRO-JUNIOR, E.L; SHIBAO, P.Y.T; FERREIRA, I.G; OLIVEIRA, I. S; CARDOSO, I. A; ARANTES, E.C. Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 4, p. 824-838, 2017.
- BÔTO, J. R. F. Isolamento e caracterização biológica e bioquímica de um ativador do factor x da coagulação presente no veneno da serpente *Bothrops erythromelas*. **Dissertação**. Universidade de Lisboa. 2016
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CARLOS, M. M. L; DE SOUSA FREITAS, P. D. F. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. **Acta Veterinaria Brasílica**, v. 1, n. 2, p. 49-55, 2007.
- DAL BELO, C. A; LUCHO, A. P. B; VINADÉ, L; ROCHA, L; FRANÇA, H. S; MARANGONI, S; RODRIGUES-SIMIONI, L. *In vitro* antiophidian mechanisms of *Hypericum brasiliense* choisy standardized extract: quercetin-dependent neuroprotection. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- DA SILVA, D. P; FERREIRA, S. S; TORRES-RÊGO, M; FURTADO, A. A; YAMASHITA, F. O; DINIZ, E. A. S; VIEIRA, D. S; URURAHY, M. A. G; SILVA-JÚNIOR, A.A; LUNA, K. P. O; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Antiophidic potential of chlorogenic acid and rosmarinic acid against *Bothrops leucurus* snake venom. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 148, p. 112766, 2022.
- DA SILVA, A. R; ANHOLETI, M. C; PIETROLUONGO, M; SANCHEZ, E.F; VALVERDE, A. L; DE PAIVA S.R; FIGUEREDO, M. R; KAPLAN, M. A. C; FULY, A.L. Utilization of the plant *Clusia fluminensis* Planch & Triana against some toxic activities of the venom of *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake venom toxic activities. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 1990-2002, 2019.
- DE SOUZA, Claudio Maurício Vieira; BOCHNER, Rosany. **Os animais peçonhentos na Saúde Pública**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2022.

- DELGADILLO, J; PALOMINO, M; LAZO, F; RODRÍGUEZ, E; GONZÁLEZ, E; SEVERINO, R; YARLEQUÉ, A. Purificación y algunas propiedades de una hialuronidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "jergón shushupe". **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 79, n. 4, p. 348-358, 2013.
- FÉLIX-SILVA, J; SILVA-JÚNIOR, A. A; ZUCOLOTTI, S. M. Medicinal plants for the treatment of local tissue damage induced by snake venoms: an overview from traditional use to pharmacological evidence. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- FERNANDES, C. A. H; CARDOSO, F. F; CAVALCANTE, W. G. L. Structural basis for the inhibition of a phospholipase A2-like toxin by caffeic and aristolochic acids. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0133370, 2015.
- DE FRANÇA, F. S; TAMBOURGI, D. V. Hyaluronan breakdown by snake venom hyaluronidases: From toxins delivery to immunopathology. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1125899, 2023.
- FONTANA, L. B; Pretto, E. M; Barboza, G. C; Basso, B. F; Souza, J. M. A; Goldschmidt, A. I. Etnobotânica: uma abordagem contextualizada, e ativa para o ensino de ciências. **REPPE-Revista de Produtos Educacionais e Pesquisas em Ensino**, v. 5, n. 2, p. 167-193, 2021.
- GIL, E. S; ENACHE, T. A; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Redox behaviour of verbascoside and rosmarinic acid. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 16, n. 2, p. 92-97, 2013.
- GÓMEZ-BETANCUR, I; GOGINENI, V; SALAZAR-OSPINA, A; LEÓN, F. Perspective on the therapeutics of anti-snake venom. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 3276, 2019.
- GUTIÉRREZ, J. M; RUCAVADO, A; ESCALANTE, T; HERRERA, C; FERNÁNDEZ, J; LOMONTE, B; FOX, J; W. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. **Toxicon**, v. 148, p. 123-131, 2018.
- GUTIÉRREZ, J. M; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, n. 4, p. 211-223, 1989.
- JAFARIPOUR, L; NASERZADEH, R; ALIZAMANI, E; MASHHADI, S. M. J; MOGHADAM, E. R; NOURYAZDAN, N; AHMADVAND, H. Effects of rosmarinic acid on methotrexate-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in wistar rats. **Indian journal of nephrology**, v. 31, n. 3, p. 218, 2021.
- JORGE, R. J. B; MONTEIRO, H. S; GONCALVES-MACHADO, L; GUARNIERI, MC; XIMENES, RM; BORGES-NOJOSA, D. M; LUNA, K. P. O; ZINGALI, R. B; CORRÊA-NETO, C; GUTIÉRREZ, J. M; SANZ, L; CALVETE, J.J. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of proteomics**, v. 114, p. 93-114, 2015.
- LIMA, L. F. P. Estudos taxonômicos e morfopolínicos em Curcubitaceae brasileiras. **Tese** (Doutorado em Botânica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 2010.

LIMA, V. M. G. D. M; SILVA, R. C. E; Galvão, R; Olinda, R; Fook, S. M. L. AVALIAÇÃO DA HEMOSTASIA E SUA RELAÇÃO COM PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS EM ACIDENTES POR *BOTHRUPS ERYTHROMELAS*. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 44, p. S558, 2022.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. Leitura & Arte, 2004.

MAMEDE, C. C. N; SIMAMOTO, B. B. S; PEREIRA, D. F. C; COSTA, J. O; RIBEIRO, M. S. M; OLIVEIRA, F. Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: Overview of the last decade. **Toxicon**, v. 187, p. 10-18, 2020.

MARKLAND, J. R. F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3-18, 2013.

NAVEED, M; HEJAZI, V; ABBAS M; KAMBOH, A. A; KHAN, G. J; SHUMZAID, M; AHMAD, F; BABAZADEH, D; FANGFANG, X; MODARRESI-GHAZANI, F; WENHUA, L; XIAOHUI, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

NUNES, E. A. C; LEITE, R. S; ALVES, A. E. F; MIGLIOLO, L; LUNA, K. P. O. Estudo da neutralização dos componentes do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* Ponta Grossa, PR: **Atena Editora** 2019. (7) :79

PAIXAO-CAVALCANTE, D; KUNIYOSHI, K. A; PORTARO, F. C. V; SILVA, W. D. S; TAMBOURGI, D. V. African adders: partial characterization of snake venoms from three Bitis species of medical importance and their neutralization by experimental equine antivenoms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003419, 2015.

PATIÑO, A. C; PEREAÑEZ, J. A; GUTIÉRREZ, J. M; RUCAVADO, A. Biochemical and biological characterization of two serine proteinases from Colombian *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Toxicon**, v. 63, p. 32-43, 2013.

PAREDES, P. F. M; VASCONCELOS, F. R; PAIM, R. T. T; MARQUES, M. M. M; DE MORAIS, S. M; LIRA, S. M; BRAQUEHAIS, I. D; VIEIRA, I. G. P; MENDES, F. N. P; GUEDES, M. I. F. Screening of bioactivities and toxicity of *Cnidocolus quercifolius* Pohl. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

QUEIROZ, G. P; PESSOA, L. A; PORTARO, F. C; DE FÁTIMA, D. F. M; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842-851, 2008.

RIBEIRO, P. P. C; DAMASCENO, M. K. S. F. S. C; VERAS, B. O; OLIVEIRA, J. R. S; LIMA, V. L. M; ASSIS, C. R. D; SILVA, M.V; JÚNIOR, F. C. S; ASSIS, C.F; PADILHA, C. R. A; STAMFORD, C. M. Chemical and biological activities of faveleira (*Cnidocolus quercifolius* Pohl) seed oil for potential health applications. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127771, 2021.

RIBEIRO, P. P. C; MEDEIROS, J. M. S; SILVA-CHAVES, K. S. F. *Cnidocolus quercifolius*: Nutritional value, bioactive activity and potential application of seed and its derivatives in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 105, p. 70-75, 2020.

- ROQUE, A. A; ROCHA, R. M; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 31-42, 2010.
- SAJEVIC, T; LEONARDI, A; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627-645, 2011.
- SANTOS, V. D; MACIEL, T. A. HERPETOFAUNA EM UMA COMUNIDADE RURAL DO NORDESTE DO BRASIL: RELATOS SOBRE MITOS NAS DIFERENTES GERAÇÕES. **Ethnoscintia-Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology**, v. 7, n. 1, p. 51-66, 2022.
- SALAMA, W. H; ABDEL-ATY, A. M; FAHMY, A. S. Rosemary leaves extract: anti-snake action against Egyptian *Cerastes cerastes* venom. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 8, n. 4, p. 465-475, 2018.
- SANTOS, K. A; DA SILVA, E. A; DA SILVA, C. Supercritical CO₂ extraction of favela (*Cnidioscolus quercifolius*) seed oil: Yield, composition, antioxidant activity, and mathematical modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 165, p. 104981, 2020.
- SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19-26, 2013.
- SILVA, J. F. Efeito inibitório do decocto das folhas de *Jatropha gossypifolia* L. contra a toxicidade local e sistêmica da peçonha da serpente *Bothrops erythromelas*. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.
- SILVESTRE, G. F. G; LUCENA, R. P; OLIVEIRA, G. D; PEREIRA, H. N; DIAS, J. A; SOUZA, I. A; ALVES, H. Anti-tumor and anti-inflammatory activity in vivo of *Apodanthera congestiflora* Cogn.(Cucurbitaceae). **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 743, 2021.
- SLAGBOOM, J; KOOL, J; HARRISON, R. A; CASEWELL, N. R. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **British journal of haematology**, v. 177, n. 6, p. 947-959, 2017.
- SOUSA, L. F; BERNARDONI, J. L; ZDENEK, C. N; DOBSON, J; COIMBRA, F; GILLET, A; LOPES-FERREIRA, M; MOURA-DA-SILVA, A. M; FRY, B. G. Differential coagulotoxicity of metalloprotease isoforms from *Bothrops neuwiedi* snake venom and consequent variations in antivenom efficacy. **Toxicology letters**, v. 333, p. 211-221, 2020.
- SUHITA, R; BEGUM, I; RASHID, M; CHANDRAN, V. P; SHASTRI, S. A; KANTAMNENI, R; RAJAN A. K; THUNGA, G. Systematic review and meta-analysis of global prevalence of neurotoxic and hemotoxic snakebite envenomation. **Eastern Mediterranean health journal**, v. 28, n. 12, p. 909-916, 2022.
- SWENSON, S; MARKLAND, J. R. F. S. Snake venom fibrin (ogen) olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1021-1039, 2005.
- THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the world health organization**, v. 61, n. 6, p. 949, 1983.

TORTORA, G. J et al. **Principios de anatomía y fisiología**. OXFORD University press, 2002.

TORRES, D. S; PEREIRA, E. C. V; SAMPAIO, P. A; SOUZA, N. A. C; FERRAZ, C. A; OLIVEIRA, A. P; MOURA, C. A; ALMEIDA, J. R. G; ROLIM-NETO, P. J; OLIVEIRA-JUNIOR, R. G; ROLIM, L. A. Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidocolus quercifolius* POHL (Euphorbiaceae) e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 41, p. 743-747, 2018.

VIDERES, Larissa Cardoso Corrêa de Araújo. *Apodanthera congestiflora* e *Myracrodruon urundeuva*: Investigação das propriedades biológicas em preparações brutas e produtos isolados **Tese** (Doutorado) Universidade Federal de Pernambuco. 2017.

TEIXEIRA, C; CURY, Y; MOREIRA, V; PICOLO, G; CHAVES, F. Inflammation induced by Bothrops asper venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 988-997, 2009.

WHITE, Julian. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 951-967, 2005.

WHO. The neglected tropical diseases: a rags-to-riches story, 2023. Disponível em: Acesso em: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1> 04 jun. 2023.

4. CONCLUSÃO

A corrente pesquisa teve por objetivo geral a avaliação do potencial de alternativas fitoquímicas como auxiliares no tratamento antiofídico. Particularmente considerando a *B. erythromelas*, que contém parcelas proteicas que fogem ao tratamento usual.

A recorrência dos acidentes botrópicos, em particular com a *B. erythromelas* associada aos efeitos desencadeados pela peçonha, que podem deixar sequelas permanentes ou mesmo evoluir a óbito, o que torna imperativo o aperfeiçoamento do tratamento e do sistema de distribuição, com a finalidade de atender melhor a população em casos de acidentes.

Como resultado a essa problemática, foi possível constatar a eficácia dos ácidos rosmarínico e clorogênico e os extratos brutos: (hidroalcoólico de *D. emetocathartica* e metanólico de *C. quercifólius*) na inibição *in vitro* das atividades enzimáticas da peçonha de *B. erythromelas*, no que diz respeito à cascata de coagulação plasmática, apresentando ácido rosmarínico para ser mais eficaz.

Quanto à inibição do efeito inflamatório via ácido hialurônico, demonstrou eficácia na redução dos efeitos da peçonha de *B. erythromelas* em todos os extratos e produtos vegetais destacando-se em *D. emetocathartica* que atingiu absorvância de 2.811 (1:200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), e até 1,57 de absorvância no composto isolado AC (Ácido Clorogênico).

Ambos os extratos estudados apresentaram importante atividade neutralizante em aspectos da soroterapia, que tende a não responder ao dano tecidual local no envenenamento botrópico.

Desse modo, foi possível abranger os objetivos propostos de forma satisfatória, com resultados promissores quanto ao emprego desses fitoquímicos frente às atividades hemorrágica e hialuronidásica *in vitro*.

Os extratos analisados nesse trabalho deverão ser analisados futuramente em relação aos acidentes ofídicos sob novas perspectivas multidisciplinares de modo a unir o fator empírico da Etnobiologia com os possíveis resultados, e novas metodologias visando principalmente elucidar as substâncias e as interações químicas envolvidas nos resultados encontrados. Da mesma forma, também são desejáveis indicações de compostos de interesse no tratamento de doenças hemostáticas e inflamatórias.

5. REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; SILVA K. N.; BASÍLIO I. J. L. D; FREITAS P. F; BARBOSA-FILHO J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALBERTO BARROS, V; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. **Advances in Zoology**, v. 2014, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Acidente por animais peçonhentos.** Período: 2020. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 12 fev 2024
- CASTRO, F. O. F. Avaliação da atividade não citotóxica do veneno da cobra *Bothrops pauloensis* em células mononucleares do sangue periférico humano. **Dissertação** (Mestrado em ciências ambientais) Pontifícia Universidade Católica de Goiás. 2011.
- COSTA-NETO, E. M. Conhecimento e usos tradicionais de recursos faunísticos por uma comunidade afro-brasileira: resultados preliminares. **Interciência**, v.25, n.9, p.423-431, 2000.
- FENG, Y; YU, Y.H; WANG, S.T; REN, J; CAMER, D; HUA, Y.Z; ZHANG, Q; HUANG, J; XUE, D.L; ZHANG, X.F; HUANG, X.F; LIU, Y. Chlorogenic acid protects D-galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 1027-1034, 2016.<https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1093510>.
- GUEDES, T. B; NOGUEIRA, C; MARQUES, O. A. V. Diversity, natural history, and geographic distribution of snakes in the Caatinga, Northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 3863, n. 1, p. 1–93-1–93, 2014.
- IÓCA, L. P.; NICÁCIO, K. J.; BERLINCK, R. G. S. Natural Products from Marine Invertebrates and Microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: Still the Challenges, More Rewards **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 998-1031, 2018.
- MATOS, F. J. A. Farmácias Vivas: Sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4 ed. **Rev. Ampliada/** F. J. de Abreu Matos. Fortaleza–CE. Editora UFC, 2002.
- PEREIRA, H. N. Estudo fitoquímico e atividade biológica das raízes de *Apodanthera congestiflora* Cogn. (Cucurbitaceae). **Dissertação** (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017. Disponível em: <<https://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/tede/4499>>. Acesso em: 20 set. 2023.
- ROQUE, A. A. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** v.12, n.1, p.31-42, 2010.
- SILVA, J. G; SOLEY, B. R; GRIS, V; PIRES, A. R. A; CADERIA, S. M. S. C; ELER, G. J; HERMOSO, A. P. M; BRACHT, A; DALSENTER, P. R; ACCO, A. Effects of the *Crotalus durissus terrificus* snake venom on hepatic metabolism and oxidative stress. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 25, n. 3, p. 195-203, 2011.
- SALVADOR, G. H. M; FLORENÇA, F; GOMES, A. A; CAVALCANTE, W. L; GALLACCI, G.M; FONTES, M. R. M. Search for efficient inhibitors of myotoxic activity induced by ophidian phospholipase A2-like proteins using functional, structural and bioinformatics

approaches. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 510, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36839-6>.

TRENTO, M. V. C; SALES, T. A; ABREU, T. S; BRAGA, M. A; CESAR, P. H. S; MARQUES, T. R; MARCUSSI, S. Exploring the structural and functional aspects of the phospholipase A2 from *Naja* spp. **International journal of biological macromolecules**, v. 140, p. 49-58, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.125>.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease**, v. 24, n. 1, p. 7-12, 2006.

6. ANEXOS

UNIVERSIDADE CATÓLICA
DOM BOSCO - UCDB



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE TOXINAS DE ORIGEM ANIMAIS E VEGETAIS

Pesquisador: LUDOVICO MIGLIOLO

Versão: 1

CAAE: 64930022.6.0000.5162

Instituição Proponente: Universidade Católica Dom Bosco

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 125722/2022

Patrocinador Prlnopal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL

Informamos que o projeto PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE TOXINAS DE ORIGEM ANIMAIS E VEGETAIS que tem como pesquisador responsável LUDOVICO MIGLIOLO, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Católica Dom Bosco - UCDB em 08/11/2022 às 08:19.

Endereço: Av. Tamandaké, 6000 Bloco Administrativo 2º Piso, Sala C007

Bairro: Jardim Seminário CEP: 79.117-000

UF: MS Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3312-3478

E-mail: oep@ucdb.br