



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS E POTENCIAL PARA FITOTERAPIA
DA ESPÉCIE VEGETAL, DE USO TRADICIONAL DA REGIÃO AMAZÔNICA,
*Bellucia dichotoma***

**MANAUS – AM
2022**

LUANA TRAVASSOS BATISTA

**PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS E POTENCIAL PARA FITOTERAPIA
DA ESPÉCIE VEGETAL, DE USO TRADICIONAL DA REGIÃO AMAZÔNICA,
*Bellucia dichotoma***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Doutora em Imunologia Básica e Aplicada, na Área de Concentração Pesquisa de novos fármacos da Biodiversidade Amazônica.

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristina dos Santos Sobreira de Sampaio
Coorientadora: Professora Doutora Keyla Emanuelle Ramos de Holanda

MANAUS – AM
2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B333p Batista, Luana Travassos
Propriedades anti-inflamatórias e potencial para fitoterapia da espécie vegetal, de uso tradicional da região amazônica, *Bellucia dichotoma* / Luana Travassos Batista . 2022
129 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Cristina dos Santos Sobreira de Sampaio
Coorientadora: Keyla Emanuelle Ramos de Holanda
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Acidentes ofídicos. 2. Plantas medicinais. 3. *Bellucia dichotoma*. 4. Fitoterapia. I. Sampaio, Maria Cristina dos Santos Sobreira de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo universo conspira a seu favor”.

Goethe

Dedicado à minha querida mãe Rosinéia Travassos (*in memoriam*), com todo meu amor e gratidão. Desejo poder ter sido merecedora dos esforços dedicados por você em todos os aspectos, em especial quanto à minha formação.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só se tornou possível pelo empenho, participação e colaboração de um grande número de pessoas. Meu muito obrigada seria pouco pela imensa gratidão que tenho a todos.

Meus mais sinceros agradecimentos:

A Deus, por sua imensa bondade e misericórdia. Tudo no tempo dEle.

À minha família: meu pai Francisco, minhas irmãs Ana e Rosália, Gabriel e Luiza, e meu namorado Alan. Obrigada por todo apoio e paciência.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Cristina dos Santos Sobreira de Sampaio, por todos os ensinamentos, pela orientação e confiança. À Profa. Dra. Keyla Emanuelle Ramos, pela coorientação e todo aprendizado adquirido.

À Dra. Valéria Mourão, fica toda a minha gratidão pela paciência, dedicação e paciência para me ensinar e apoiar durante elaboração e execução do meu projeto. Sem você, com certeza, essa caminhada seria mais difícil.

A Dra. Sandra Sarrazin e Dra. Rosa Helena Mourão, por sempre se mostrarem dispostas a contribuir com meu trabalho. A parceria de vocês foi fundamental!

Às doutorandas e parceiras Patrícia Simas, Adriane Jorge, Jaqueline Oliveira e Lucianna Tezza, meu muito obrigada pela disponibilidade, ensinamentos, incentivos e colaboração na execução de técnicas e empréstimo de materiais, que foram essenciais a elaboração desse trabalho.

À Profa. Dra. Geane Antiques, pelos valorosos ensinamentos com a experimentação animal.

Aos colaboradores da Fiocruz Manaus, Dr. Yuri Chaves, Dra. Elizangela, Msc. Ivanildes e a mestrandia Rebeca, pelo apoio na cultura de células e na citometria de fluxo.

A Profa. Dra. Fernanda Guilhon e a doutoranda Talita, pela colaboração com a produção dos meus extratos.

A Profa. Dra. Patrícia Oliveira, pelo auxílio com experimentos em cultura de células.

Aos colaboradores da Universidade Federal do Oeste do Pará, Beatriz, Adenilson, Elenn e Deise. Todo meu carinho.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pela oportunidade e formação acadêmica.

À Universidade Federal do Oeste do Pará, pela parceria no desenvolvimento do meu trabalho, em especial ao Laboratório de Bioprospecção.

À FAPEAM, pelo apoio financeiro através do projeto Universal.

Aos professores do PPGIBA, pelas contribuições nas disciplinas e no desenvolvimento do meu trabalho, em especial à Profa. Dra. Jerusa Quintão, pela colaboração no meu trabalho.

Aos queridos Fernanda, Andrews e Katheane, obrigada pela doação do tempo e conhecimento de vocês para o meu trabalho.

À minha amiga Gracielle, pelas conversas literárias, por compartilhar os momentos de angústias e alegrias, muito obrigada.

Aos colegas do Laboratório de Imunoquímica, Ília Gilmar, Rafael Souza, Dany Caroline, Maria Carolina Scheffer de Souza e Nathalie Marte, pelas conversas e apoio.

À Dra. Aguyda Rayandra, pela colaboração com seu conhecimento e com materiais para os experimentos em cultura de células.

Ao Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) e Laboratório de Purificação de Biomoléculas, pela oferta da estrutura em algumas análises, e aos técnicos de laboratório Júlio e Paulo, sempre receptivos e colaborativos.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital Joãozinho: Bruno, Suziane, Iracélia, Iraniane, Aline, Francisco e Ester. Não foi fácil fazer essa caminhada no meio de uma pandemia e sendo profissional da saúde, mas vocês sempre estiveram me incentivando.

Aos secretários do PPGIBA, Edson, Ana Paula e Magda, por sempre se mostrarem prestativos e inúmeras vezes me socorrerem com documentos e solicitações de entrada.

A todos os discentes do PPGIBA, em especial aos meus colegas de turma, com quem dividi muitas experiências e risos durante a realização das disciplinas.

Muito obrigada!

RESUMO

Para a serpente *Bothrops atrox* é atribuída a maioria dos acidentes ofídicos na região Norte do Brasil e seu envenenamento se caracteriza por lesões locais intensas, distúrbios hemostáticos e inflamação relevante. Em algumas regiões do país onde o atendimento dos acidentados por serpentes é precário, as plantas medicinais têm se apresentado como alternativa de tratamento ou como coadjuvante à soroterapia. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório de *Bellucia dichotoma*, espécie vegetal nativa da região Amazônica, que é utilizada na medicina tradicional para tratar envenenamentos por serpentes, para o desenvolvimento de um fitoterápico com propriedades antiofídicas. O extrato seco de *B. dichotoma* foi avaliado para as seguintes atividades *in vitro*: citotoxicidade e bloqueio na atividade inflamatória induzida pelo veneno de *B. atrox* em macrófagos diferenciados de células de linhagem leucêmica imortalizadas – THP-1 – pela quantificação de citocinas, produção espécies reativas (ROS) e expressão de COX, e avaliação do potencial de cicatrização pelo ensaio de motilidade celular em células fibroblastos humano da linhagem MRC-5. Foi realizado o ensaio de toxicidade aguda via oral do extrato de *B. dichotoma*, em ratos Wistar, para avaliar a segurança farmacológica da espécie e emprego em formulações fitoterápicas. Uma forma farmacêutica sólida oral do tipo granulada efervescente foi desenvolvida, avaliada quanto a estabilidade térmica e caracterização físico-química, e testada quanto a seu potencial anti-inflamatório em edema de pata induzido pela peçonha de *B. atrox*, sendo a produção do extrato e o ensaio biológico realizados de modo similar ao uso tradicional. Os resultados mostraram que a viabilidade celular em células THP-1 do extrato seco de *B. dichotoma* foi de aproximadamente 100% até a concentração 50µg/ mL, porém a concentração capaz de causar a morte da mesma proporção de células está acima de 1000µg/ mL. Na análise citotóxica de veneno de *B. atrox* a dose 1000µg/ mL capaz de causar 100% da morte celular e a IC₅₀ de 527,8 µg/mL determinada por curva log. A partir desses resultados, foi realizado os ensaios de atividade de bloqueio da resposta inflamatória induzida pelo veneno de *B. atrox* na dose 527,8 µg/mL em macrófagos THP-1. Os resultados mostraram que, os macrófagos desafiados com veneno de *B. atrox* tiveram aumento na produção da citocina pró-inflamatória TNF-α e da citocina IL-12p70, e que quando tratados com extrato de *B. dichotoma* apresentaram redução na produção dessas citocinas. O extrato de *B. dichotoma* apresentou efeito antioxidante dose dependente, ao reduzir o estresse oxidativo induzido por veneno de *B. atrox* em macrófagos THP-1. O veneno de *B. atrox* não induziu a produção de COX na linhagem de células THP-1 utilizada, não sendo possível avaliar o potencial de bloqueio de *B. dichotoma* na via de produção de mediadores lipídicos. Quando avaliado o potencial de cicatrização de *B. dichotoma*, no ensaio com MRC-5, as células tratadas com o extrato vegetal nas doses 1 e 5 µg/mL apresentaram migração celular até 20% mais eficaz que o controle positivo Vitamina C, usada como padrão ouro. Na caracterização térmica, observou-se a estabilidade térmica do extrato seco, apresentando apenas dois eventos de perda de massa, nos intervalos 25-105°C (Δm=4,68%) e 239- 318°C (Δm=19,06%). A partir do ensaio de toxicidade aguda não foram observados sinais de toxicidade do extrato de *B. dichotoma* até a dose de 2000 mg/Kg, que corresponde a duas vezes a dose recomendada pela ANVISA para avaliar toxicidade de substâncias. A partir dos resultados prévios, foi desenvolvido um granulada efervescente à base do extrato de *B. dichotoma*. No que diz respeito aos granulados, a formulação que apresentou melhores características organolépticas e de efervescência foi utilizada para avaliar o efeito bloqueador da ação edematogênica de *Bellucia dichotoma*. O lote de bancada com peso final de 4 gramas e 7,25% de extrato seco de *B. dichotoma* obtido utilizando o processo molhagem por malaxagem apresentou boa efervescência, sem formação de grumos, quando efervescido em 60 mL de água destilada. Os resultados do ensaio antiedematogênico mostraram que o granulada na concentração de 566,6 mg/kg foi tão eficaz quanto o controle positivo, o soro antiofídico (SAB), em reverter

o edema induzido pelo veneno de *B. atrox*, em pata de camundongo. Dessa forma, foi evidenciado a capacidade da espécie *Bellucia dichotoma* em bloquear efeitos inflamatórios induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops atrox* e o potencial fitoterápico dessa espécie vegetal. Estes achados são de grande relevância para a população local da região Amazônica, que utilizam *Bellucia dichotoma* como recurso terapêutico alternativo ou complementar ao soro que, embora seja o tratamento padrão, apresenta limitações quanto a administração e em reverter efeitos locais graves induzidos pelo veneno.

Palavras-chave: Acidentes ofídicos; plantas medicinais; *Bellucia dichotoma*; fitoterapia

ABSTRACT

To the *Bothrops atrox* snake is attributed the majority of ophidic accidents in the northern region of Brazil and its envenomation is characterized by intense local lesions, hemostatic disorders, and relevant inflammation. In some regions of the country where the treatment of snake accident victims is precarious, medicinal plants have been presented as an alternative treatment or as an adjunct to serotherapy. This work aimed to evaluate the anti-inflammatory potential of *Bellucia dichotoma*, a plant species native to the Amazon region, which is used in traditional medicine to treat snake poisoning, for the development of a phytotherapeutic with antiophidic properties. The dried extract of *B. dichotoma* was evaluated for the following *in vitro* activities: cytotoxicity and blockade in the inflammatory activity induced by *B. atrox* venom in differentiated macrophages of immortalized leukemic cell line - THP-1- by quantification of cytokines, reactive species (ROS) production and COX expression, and evaluation of the healing potential by cell motility assay in human fibroblast cells of the MRC-5 line. An oral acute toxicity test of *B. dichotoma* extract was performed on Wistar rats to evaluate the pharmacological safety of the species and its use in herbal formulations. An effervescent granule-type solid oral pharmaceutical form was developed, evaluated for thermal stability and physicochemical characterization, and tested for its anti-inflammatory potential in paw edema induced by *B. atrox* venom. The results showed that cell viability in THP-1 cells from the dry extract of *B. dichotoma* was approximately 100% up to the concentration 50 μ g/ mL, but the concentration capable of causing death of the same proportion of cells is above 1000 μ g/ mL. In the cytotoxic analysis of *B. atrox* venom the dose 1000 μ g/ mL able to cause 100% cell death and the IC₅₀ of 527.8 μ g/mL determined by log curve. Based on these results, we performed the activity assays for blocking the inflammatory response induced by *B. atrox* venom at a dose of 527.8 μ g/mL in THP-1 macrophages. The results showed that macrophages challenged with *B. atrox* venom had increased production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α of the cytokine IL-12p70, and that when treated with *B. dichotoma* extract they showed decreased production of these cytokines. *B. dichotoma* extract showed a dose-dependent antioxidant effect by reducing oxidative stress induced by *B. atrox* venom in THP-1 macrophages. *B. atrox* venom did not induce COX production in the THP-1 cell line used, so it is not possible to evaluate the potential of *B. dichotoma* for blocking the lipid mediator production pathway. When the healing potential of *B. dichotoma* was evaluated, in the assay with MRC-5, the cells treated with the plant extract at doses 1 and 5 μ g/mL showed cell migration up to 20% more effective than the positive control Vitamin C, used as gold standard. In thermal characterization, thermal stability of the dried extract was observed, showing only two mass loss events, in the intervals 25-105°C (Δ m=4.68%) and 239- 318°C (Δ m=19.06%). From the acute toxicity test no signs of toxicity of *B. dichotoma* extract were observed up to a dose of 2000 mg/Kg, which corresponds to twice the dose recommended by ANVISA to evaluate toxicity of substances. From the previous results, an effervescent granulate based on the *B. dichotoma* extract was developed. With regard to granulates, the formulation that presented the best organoleptic and effervescence characteristics was used to evaluate the blocking effect of the edematogenic action of *Bellucia dichotoma*. The bench batch with a final weight of 4 grams and 7.25% dry extract of *B. dichotoma* obtained using the malax molting process showed good effervescence, without lump formation, when effervesced in 60 mL of distilled water. The results of the antiedematogenic assay showed that the pellet at a concentration of 566.6 mg/kg was as effective as the positive control, the antitropic serum (ABS), in reversing the edema induced by *B. atrox* venom in mouse paws. Thus, the capacity of *Bellucia dichotoma* to block inflammatory effects induced by *Bothrops atrox* snake venom and the phytotherapeutic potential of this plant species were evidenced. These findings are of great relevance to the local population of the Amazon region, who use *Bellucia dichotoma* as an alternative or

complementary therapeutic resource to the serum that, although it is the standard treatment, has limitations regarding administration and in reversing severe local effects induced by the venom.

Keywords: Snakebites; Medicinal plants; *Bellucia dichotoma*; Phytotherapy

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1:** Etapas do processo inflamatório..... 19
- Figura 2:** Material vegetal de *Bellucia dichotoma*..... 32

Capítulo II

- Figura 1:** Dentição solenóglifa presente em espécies da família Viperidae..... 46
- Figura 2:** Serpente *Bothrops atrox*..... 46

Capítulo IV

- Figura 1:** Determinação de citotoxicidade do extrato de *Bellucia dichotoma* e do veneno de *Bothrops atrox* em macrófagos THP-1 pelo ensaio Alamar blue..... 92
- Figura 2:** Efeito do extrato de *Bellucia dichotoma* sobre a produção de iROS em macrófagos THP-1..... 92
- Figura 3:** Efeito do extrato de *Bellucia dichotoma* sobre a produção de COX em macrófagos THP-1 desafiados com veneno de *Bothrops atrox*..... 93
- Figura 4:** Marcação em citometria de fluxo de macrófagos THP-1 controle negativo e controle positivo..... 94
- Figura 5:** Marcação em citometria de fluxo de macrófagos THP-1 desafiadas com veneno de *Bothrops atrox* e tratadas com extrato de *Bellucia dichotoma*..... 94
- Figura 6:** Efeito dos desafios veneno de *Bothrops atrox* e LPS, e tratamento com extrato de *Bellucia dichotoma* na produção de TNF- α , IL-12p70 e IL-10 por macrófagos THP-1..... 96
- Figura 7:** Efeito proliferativo do extrato de *Bellucia dichotoma* no ensaio de motilidade celular com linhagem MRC-5..... 97
- Figura 8:** Efeito do extrato de *Bellucia dichotoma* sobre a motilidade celular de MRC-5 em relação aos controles..... 97

Capítulo V

- Figura 1:** Medição diária de tônus muscular de ratos fêmeas *Wistar* para avaliação de toxicidade do extrato de *Bellucia dichotoma*..... 117
- Figura 2:** Média de peso diário de ratos fêmeas *Wistar* para avaliação de toxicidade do extrato de *Bellucia dichotoma*..... 117
- Figura 3:** Curva de Termogravimetria do extrato de *Bellucia dichotoma* obtida na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, utilizando fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹..... 119
- Figura 4:** Curva de Calorimetria Diferencial Exploratória do extrato de *Bellucia dichotoma* obtida na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, utilizando fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹..... 120

Figura 5: Granulado efervescente de <i>Bellucia dichotoma</i> 24 horas após o preparo.....	122
Figura 6: Potencial de bloqueio de diferentes doses do fitoterápico a base de extrato de <i>Bellucia dichotoma</i> frente a atividade edematogênica induzida pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i>	123
Figura 7: Potencial de bloqueio das doses 283,3 mg/kg e 566,6 mg/kg do fitoterápico a base de extrato de <i>Bellucia dichotoma</i> , com e sem Soro antibitrópico, como coadjuvante, frente a atividade edematogênica induzida pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i>	123

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Capítulo III

Quadro 1: Espécies vegetais prescritas/ ofertadas nos serviços de saúde público brasileiro.....	70
--	----

Capítulo V

Tabela 1: Porcentagem de extrato aquoso seco de <i>Belucia dichotoma</i> e dos excipientes utilizados na formulação de granulado efervescente relativas aos Lotes de Bancada (I a IV).....	114
Tabela 2: Efeito do extrato de cascas de <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn. nos parâmetros hematológicos de ratos <i>Wistar</i> fêmeas tratados para toxicidade aguda.....	118
Tabela 3: Caracterização físico-química do placebo e do granulado efervescente a base de <i>Bellucia dichotoma</i>	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B. atrox – *Bothrops atrox*
B. dichotoma – *Bellucia dichotoma*
CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais
CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX – ciclooxigenase
DCFDA – 2',7'-Acetato Diclorofluoresceína
DME – Dose Mínima Edematogênica
DL₅₀ – Dose capaz de matar 50% da população
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – Dimetilsulfóxido
DSC – Calorimetria exploratória diferencial
FLONA – Floresta Nacional do Tapajós
FBS – Soro Bovino Fetal
GPS – Sistema Global de Medição e Posição
ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IC₅₀ – Concentração capaz de inibir 50% da população
IL – Interleucina
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LPS – Lipopolissacarídeo
LPZ – Laboratório de Pesquisa Zoológica
OMS – Organização Mundial da Saúde
PVP K30 – polivinilpirrolidona
PMA – Phorbol12-myristate13-acetate
iROS – Espécies Reativas de Oxigênio intracelular
RPMI – Gibco Roswell Park Memorial Institute
SAB – Soro Antibotrópico
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e dos Conhecimentos Tradicionais Associados
TG – Termogravimetria
TNF – Fator de Necrose Tumoral
°C – graus Celsius
CO₂ – Dióxido de carbono
µg – micrograma
µL – microlitro
µM – micromolar
mg – micrograma
mL – mililitro
ng – nanograma
rpm – Rotações por minuto
pH – potencial de hidrogênio

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	17
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Aspectos gerais da inflamação.....	18
2.2 Eventos vasculares e celulares da inflamação.....	20
2.3 Mediadores do processo inflamatório.....	23
2.4 Resposta inflamatória e envenenamento ofídico.....	25
2.5 Estudo do processo inflamatório baseado em modelos experimentais.....	28
2.6 O uso de plantas medicinais com propriedades anti-inflamatórias.....	29
2.7 Gênero <i>Bellucia</i>	31
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
Referências Bibliográficas.....	35
CAPÍTULO II: Acidentes atribuídos à serpente <i>Bothrops atrox</i> : Imuno-fisiopatologia e tratamento (<i>Artigo Publicado na Revista Eletrônica Scientia Amazonia</i>).....	46
CAPÍTULO III: Plantas Mediciniais e Fitoterápicos no sistema de saúde brasileiro: uma revisão da literatura (<i>Artigo Publicado na Revista Eletrônica Scientia Amazonia</i>).....	70
CAPÍTULO IV: Avaliação do Potencial Anti-inflamatório de <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn sobre o veneno de <i>Bothrops atrox</i>	84
Resumo.....	84
1. INTRODUÇÃO.....	84
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	86
2.1 Material vegetal.....	86
2.1.1 Coleta do Material vegetal.....	86
2.1.2 Preparo do extrato de <i>Bellucia dichotoma</i>	86
2.2 Obtenção do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	87
2.3 Avaliação das atividades biológicas do extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i>	87
2.3.1. Atividade bloqueadora da inflamação em células.....	87
2.3.1.1 Preparo das Células THP-1 em Cultura.....	87
2.3.1.2 Realização do ensaio de Alamar Blue.....	88

2.3.1.3 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (iROS).....	88
2.3.1.4 Avaliação do bloqueio da expressão das enzimas COX-1 e COX-2 induzidas pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i>	89
2.3.1.5 Citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas.....	89
2.3.2 Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vitro</i>	90
2.3.2.1 Avaliação da citotoxicidade em células MRC-5.....	90
2.3.2.2 Realização do ensaio de motilidade celular.....	90
3. RESULTADOS.....	91
3.1 Rendimento do material vegetal.....	91
3.2 Ensaio de Citotoxicidade em cultura de células THP-1.....	91
3.3 Efeito do extrato de <i>Bellucia dichotoma</i> sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (iROS).....	92
3.4 Bloqueio da expressão de COX-1 e COX-2.....	93
3.5 Ensaio de quantificação de citocinas	94
3.6 Ensaio de Motilidade celular.....	96
4. DISCUSSÃO.....	98
CONCLUSÕES.....	102
Referências Bibliográficas.....	102
CAPÍTULO V: Potencial Antiofídico de um Granulado Efervescente à base de <i>Bellucia dichotoma</i>	109
Resumo.....	109
1. INTRODUÇÃO.....	109
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	110
2.1 Material vegetal.....	110
2.1.1 Coleta do Material vegetal.....	110
2.1.2 Obtenção da solução extrativa e extrato seco.....	111
2.2 Obtenção do veneno de <i>Bothrops atrox</i> e do soro antiofídico.....	111
2.3 Animais.....	112
2.4 Ensaio de Toxicidade Aguda do extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i>	112
2.5 Desenvolvimento da forma farmacêutica sólida granulado efervescente base de <i>Bellucia dichotoma</i>	113
2.5.1 Análises preliminares.....	113
2.5.1.1 Determinação do pH da solução extrativa.....	113
2.5.1.2 Análise térmica.....	113
2.5.2 Desenvolvimento tecnológico para a forma farmacêutica sólida granulado efervescente.....	113

2.5.3 Caracterização físico-química da formulação.....	115
2.5.3.1 Avaliação das características organolépticas.....	115
2.5.3.2 Avaliação de <i>pH</i>	115
2.5.3.3 Determinação da umidade.....	115
2.6 Atividade bloqueadora da ação edematogênica do granulado efervescente à base de <i>Bellucia dichotoma</i>	115
2.6.1 Seleção dos animais.....	115
2.6.2 Ensaio de atividade antiedematogênica.....	115
2.7 Análise Estatística.....	116
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
3.1 Avaliação da toxicidade aguda.....	117
3.2 Análise pré-formulação.....	119
3.2.1 Caracterização da solução extrativa.....	119
3.2.2 Análise Térmica do extrato seco de <i>Bellucia dichotoma</i>	119
3.3 Caracterização físico-química das formulações.....	120
3.4 Ensaio de atividade bloqueadora da ação edematogênica.....	122
CONCLUSÕES.....	125
Referências Bibliográficas.....	125
<i>Anexo</i>	129

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

A região Amazônica é bem reconhecida por sua rica diversidade biológica, sendo alvo de inúmeras pesquisas científicas que investigam não apenas as espécies vegetais e animais ali presentes, mas também o conhecimento tradicional das populações locais, que pode ser fonte de informações para o aproveitamento biotecnológico dos recursos da região. Nesse sentido, extratos vegetais de plantas amazônicas são investigados quanto ao seu potencial terapêutico em inúmeras atividades biológicas, dentre estes, o antiofídico. No entanto, ainda são poucos os estudos que buscam validar a eficácia de extratos vegetais, avaliando possíveis efeitos tóxicos e padronizando um bioproduto, a fim de garantir segurança e eficácia ao uso de plantas medicinais de nossa região.

Com o objetivo de contribuir com o conhecimento do potencial fitoterápico de plantas medicinais da região Amazônica, o presente estudo avaliou a capacidade de bloqueio do extrato de *Bellucia dichotoma* sobre o edema induzido pelo veneno de *Bothrops atrox*, bem como seu efeito cicatrizante e riscos de toxicidade, e propôs um bioproduto fitoterápico à base de seu extrato vegetal. Para isso, a tese foi estruturada em cinco capítulos, sendo neste primeiro realizado a contextualização da pesquisa e apresentado os objetivos propostos. Os demais capítulos foram escritos na forma de artigos científicos e seguem as normas da revista onde foram publicados e as normas da ABNT.

No Capítulo II foi realizado uma revisão da literatura sobre envenenamento por *Bothrops atrox*, abordando os mecanismos induzidos pelos constituintes da peçonha que levam ao quadro patológico, e ainda o tratamento para esses acidentes no Brasil.

No Capítulo III, através de uma revisão, é realizado uma abordagem sobre a fitoterapia no contexto da saúde pública brasileira, pontuando como estão disponíveis no Sistema Único de Saúde – SUS as plantas medicinais e fitoterápicos.

Sabendo que os efeitos locais do envenenamento ofídico são produzidos por uma resposta inflamatória induzida pelos constituintes do veneno, no Capítulo IV, por meio de protocolos experimentais em culturas de células, são avaliados o efeito bloqueador do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* sobre o edema induzido pelo veneno de *Bothrops atrox* e o potencial cicatrizante dessa espécie vegetal.

No Capítulo V avaliou-se a toxicidade do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*, conforme as recomendações da ANVISA para toxicidade aguda, e formulou-se um granulado efervescente à base de *B. dichotoma*, sendo avaliado a manutenção de suas propriedades

antiofídicas pelo ensaio pré-clínico de edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops atrox*. Ao final deste capítulo são apresentados as considerações finais e item anexado, que corresponde ao parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA.

Vale ressaltar que os capítulos II e III foram elaborados com o intuito de realizar uma abordagem adicional sobre elementos centrais dessa pesquisa, envenenamento por *Bothrops atrox*, que representa um importante agravo na região Amazônica, e a fitoterapia, que também é um importante recurso da população local. Os dois artigos de revisão foram dispostos como resultados, tendo em vista que foram escritos no ápice do período pandêmico, que devido a medidas de isolamento social, inviabilizou alguns ensaios inicialmente propostos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da inflamação

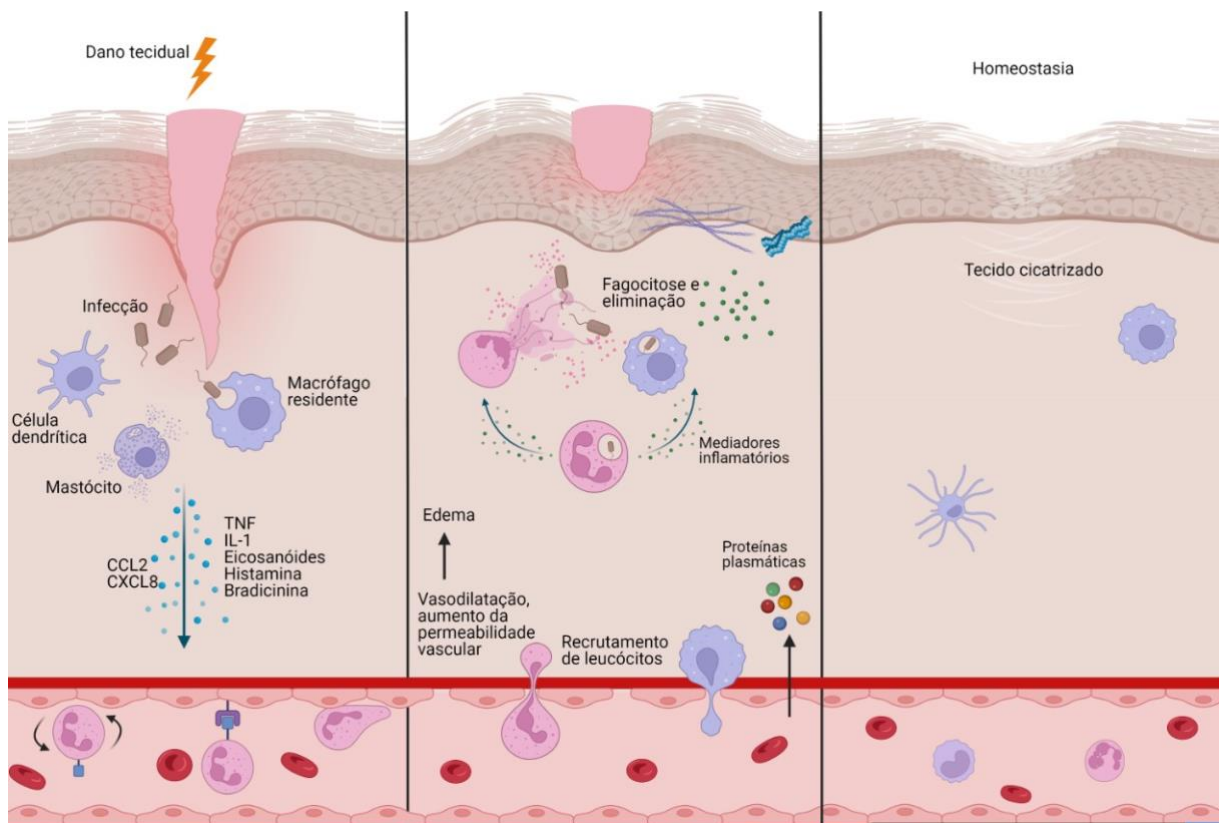
Quando ocorre uma lesão tecidual causada por micro-organismos, trauma, agentes químicos, como as toxinas, calor ou qualquer outro fenômeno, diversas substâncias são liberadas pontualmente pelo tecido danificado, causando, secundariamente, alterações nos tecidos não lesionados ao redor. A inflamação aguda é a resposta fisiológica inicial a estes diferentes desafios com o objetivo de restaurar a homeostase. Nesse sentido, uma resposta inflamatória bem estabelecida resulta na eliminação do agente lesivo desencadeador, seguido de uma fase de resolução e reparo (SERHAN; SAVILL, 2005; MEDZHITOV, 2008).

Embora seja um mecanismo de proteção do organismo a danos, é necessário que a resposta inflamatória seja resolvida, pois, quando a inflamação não é adequadamente contida, pode ocasionar doenças inflamatórias imunomediadas, rejeição de transplantes ou falha no processo de cicatrização. Dessa forma, a reação inflamatória quando excessiva pode levar a danos teciduais, podendo ainda evoluir para descompensação fisiológica, disfunção orgânica, desenvolvimento de doenças crônicas e morte (TAAMS, 2018).

A descrição das reações inflamatória consta desde a antiguidade. No século IV a.C, na Grécia antiga, Hipócrates já fazia referências a inflamação. Por volta de 40 d.C., Celsus definiu os sinais da inflamação como dor, rubor (vermelhidão), calor e tumor (edema), e Galeno, no século II d.C., propôs um quinto sinal, a perda da função. A partir desses conceitos iniciais, muitos estudos foram realizados para descrever os mecanismos envolvidos no estabelecimento da resposta inflamatória e a evolução para um estado patológico (NATHAN, 2002; MEDZHITOV, 2010; KUPRASH; NEDOSPASOV, 2016).

De forma geral, o processo inflamatório pode ser iniciado pelo reconhecimento do agente ou estímulo lesivo, que ativa componentes do sistema imune, resultando em uma resposta celular, formação de espécies reativas de oxigênio e liberação de diferentes mediadores inflamatórios. Esses fatores causam alterações microvasculares, com sequestro de células leucocitárias nos capilares, alterações na perfusão tecidual e migração leucócitos por mecanismos quimioáticos. O recrutamento de leucócitos inflamatórios presentes no sangue, em conjunto com células imunes residentes no tecido, assegura uma resposta rápida para eliminar o agente lesivo (Figura 1) (MENKIN; WARNER, 1937; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; SOTO-HEREDERO et al., 2020).

Figura 1: Etapas do processo inflamatório. A resposta inflamatória depende de interações celulares e moleculares entre o sistema imunológico, o sistema vascular e o tecido. O processo inflamatório pode ser iniciado por mecanismos indutores como: fatores imunológicos, mecânicos e físicos (por exemplo: infecção, queimaduras). Estes disparos induzem uma resposta celular com liberação de mediadores inflamatórios que levarão a alterações vasculares e migração leucocitária. Simultaneamente ocorre síntese de fatores e crescimento, angiogênese e formação de tecido (cicatrização e remodelação), restabelecendo a homeostase.



Fonte: elaborado no BioRender.

A inflamação pode ser classificada, com base no tempo e nas características patológicas, em aguda e crônica. A fase aguda, de duração relativamente curta, podendo ocorrer por horas ou dias, é caracterizada pela migração de leucócitos, principalmente

granulócitos, para o local da lesão em uma sequência de eventos facilitada por mediadores solúveis, como citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda (GABAY; KUSHNER, 1999; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; GERMOLEC et al., 2018).

Dependendo da duração do estímulo, da intensidade da resposta à inflamação e o comprometimento do sistema imune, a inflamação pode evoluir para uma forma crônica, que é caracterizada por infiltração e ativação excessiva de leucócitos, com presença de células como linfócitos e macrófagos, angiogênese e formação de tecido conjuntivo, depuração retardada e dano tecidual, com duração prolongada, semanas, meses ou anos de inflamação ativa (MEDZHITOV, 2008; SPITE; SERHAN, 2010). A inflamação crônica persistente aumenta o risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, como Artrite Reumatoide, esclerose, doença inflamatória intestinal, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer. (SCHETT; NEURATH, 2018).

2.2 Eventos vasculares e celulares da inflamação

Os eventos vasculares desempenham importante papel na resposta inflamatória, e são responsáveis pelos sinais de vermelhidão, aumento de tamanho e de temperatura observados na inflamação. Esses eventos compreendem alterações hemodinâmicas, que promovem o extravasamento de proteínas plasmáticas para tecidos subjacentes. Os mecanismos que culminam nesses eventos iniciam por uma dilatação dos vasos sanguíneos, em particular das veias pós-capilares, favorecendo o aumento do fluxo sanguíneo. Em seguida, ocorre mudanças estruturais no endotélio vascular, com contração das células endoteliais e abertura de junções entre células, causando o aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, fluxo de fluido rico em proteínas do compartimento intravascular para o interstício, o que caracteriza o edema. Este último evento acarreta aumento da viscosidade do sangue e redução do fluxo sanguíneo local. As alterações hemodinâmicas observadas promovem mudanças da orientação de células sanguíneas, propiciando a marginalização leucocitária (RANKIN, 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

As interações entre os leucócitos e outras células é um processo multimediado, em que as células que migram encontram nos tecidos diferentes sinais que orientam a migração, e moléculas de adesão que facilitam e mantêm a interação entre as células (RANKIN, 2004). A inflamação se inicia pelo reconhecimento celular do agente causador do desequilíbrio por células inflamatórias. Existem receptores específicos que são expressos na superfície dessas células, que ao reconhecerem os agentes indutores da inflamação, ativam as vias de

sinalização inflamatória intracelular, induzindo a liberação de mediadores (MEDZHITOV, 2010).

Os desencadeadores da resposta inflamatória são responsáveis por induzir e mediar a inflamação. Os indutores dão início a resposta, ativando sensores especializados que provocam a produção de conjuntos específicos de mediadores. Podem ser de origem exógena ou endógena, sendo os exógenos classificados em microbianos e não microbianos. Indutores microbianos incluem Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMP), que são padrões moleculares conservados por classes de micro-organismos, e os fatores de virulência (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; MEDZHITOV, 2007). Quando os PAMP são reconhecidos por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR) em células do sistema imune inato, desencadeiam uma resposta inflamatória. Já os indutores de origem não microbiana incluem alérgenos, corpos estranhos e compostos tóxicos, como as toxinas animais. Os indutores endógenos consistem em sinais produzidos por tecidos estressados, danificados ou com mau funcionamento. Moléculas endógenas que são liberadas durante o dano tecidual foram chamadas de Padrões Moleculares Associados aos Danos (DAMP) (LAND, 2003; CHEN; NUÑEZ, 2010; GONG et al., 2020).

Os mecanismos de reconhecimento celular do agente causador do desequilíbrio são mais bem caracterizados para as respostas inflamatórias que envolvem micro-organismos. A resposta imune é desencadeada por PRR, codificados na linhagem germinativa, que reconhecem moléculas conservadas e vitais, expressas por uma grande variedade de micro-organismos. Estes PRR incluem os receptores do tipo Toll (TLR) - localizados nas membranas celulares e endossomas-, receptores citosólicos do tipo NOD (receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo) NLR, receptores de lectina tipo C, receptores do tipo RIG-1 e receptores do tipo AIM₂. Outros receptores incluem aqueles capazes de detectar danos, consequência de inflamação e infecção, os receptores não PRR, que incluem o receptor para produtos finais da glicação avançada (RAGE), receptores expressos em células mieloides (TREM) e vários receptores acoplados à proteína G (GPCR) e canais iônicos (CAO, 2016; KAUR; SECORD, 2019; GONG et al., 2020).

Inicialmente, o exsudato celular é caracterizado pela predominância de neutrófilos, e posteriormente por células mononucleares. Estas células realizam o processo de fagocitose, visando a resolução do evento lesivo. Os neutrófilos, células de fluxo livre dentro da corrente sanguínea são os primeiros a serem recrutados para a resposta inflamatória, e ao atingirem o sítio inflamatório levam à ativação de funções efetoras específicas, como liberação de ROS,

degranulação, formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET) e fagocitose (KOLACZKOWSHA; KUBES, 2013; MARGRAF; LOWELL; ZARBOCK, 2022).

Os macrófagos são as principais células efetoras do sistema mononuclear fagocitário e componentes chave da resposta imune inata. Estas células estão presentes em todos os compartimentos do corpo em condições fisiológicas homeostáticas. Além da função fagocítica, possuem atividade secretória de uma grande diversidade substâncias biologicamente ativas, que incluem proteínas plasmáticas e substâncias que modulam outras células, tais como: citocinas, prostaglandinas, componentes do Sistema Complemento, ROS, entre outras (NATHAN, 1987; POLLARD, 2009; LOCATI; CURTALE; MANTOVANE, 2020). A secreção destas substâncias é responsável pela multifuncionalidade dos macrófagos, assim como pela participação em processos fisiológicos e fisiopatológicos, entre estes a inflamação (TAPPER, 1996).

Além de expressarem uma vasta quantidade de receptores da imunidade inata, uma característica importante dos macrófagos é a sua plasticidade. Assim, em resposta a estímulos do microambiente, essas células podem adotar fenótipos polarizados para propriedades funcionais específicas: M1, classicamente ativados, liberam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, e M2, alternativamente ativados, com um fenótipo mais imunossupressor e envolvidos no reparo tecidual (RUYTINX et al., 2018; LOCATI; CURTALE; MANTOVANI, 2020). No entanto, baseado em seu perfil de citocinas, repertório de superfície e características diferentes dos perfis M1 e M2, outros fenótipos de macrófagos têm sido investigados (HRISTODOROV et al., 2012; ERBEL et al., 2015).

A partir da inflamação aguda, mediada por elementos da imunidade inata, são fornecidos sinais essenciais para ativação dos linfócitos T virgens, pelas células dendríticas, e o desenvolvimento da imunidade adaptativa. Células T da linhagem CD4⁺ secretam citocinas e expressam moléculas de superfície que podem regular outras células imunes, por isso são chamadas de células T auxiliares (Th). As células Th são classificadas em subpopulações com base em seus perfis de expressão de citocinas e funções imunes regulatórias, cuja geração é regulada por citocinas e fatores de transcrição. São reconhecidos subtipos distintos de Th: Th1, Th2, Th9, Th17, Th 22, Treg (T reguladoras) e Tfh (T folicular) (SALLUSTO, 2016; ZHENG et al., 2020; ZHU; ZHU, 2020).

As células Th1, envolvidas nas respostas à infecções por patógenos intracelulares como vírus, auxiliam as células T CD8⁺ citotóxicas na lise de células infectadas e produzem citocinas que promovem o aumento na apresentação de antígenos, facilitando a função fagocitária pelos macrófagos. Já as células Th2 desempenham funções na defesa contra

parasitas extracelulares e alérgenos. As células Th17 são componentes essenciais do sistema imune, e principais produtoras de citocinas IL-17, conferindo proteção contra bactérias extracelulares e fungos, mas cuja superativação pode causar distúrbios imunomediados (KUMAR et al., 2019; CERBONI et al., 2020; DONG, 2021).

Mais recentemente reconhecidas, células Th9 podem estimular a captação e apresentação de antígenos por células dendríticas para ativação de células T CD8⁺, enquanto Th22, abundantes na pele, desempenham funções na cicatrização de feridas e podem desempenhar papel na patogênese de doenças autoimunes. Células Tfh ajudam na produção de anticorpos pelas células B e as Treg regulam as respostas imunes, mantendo a homeostase da imunidade celular e prevenindo estados patológicos imunomediados. As citocinas exercem papel fundamental para determinar a diferenciação de células T em linhagem imunorreguladoras (Treg) ou pró-inflamatórias (Th1 e Th17) (WANG et al., 2020; BASU et al., 2021; DONG, 2021; JIANG et al., 2021; KERVEVAN; CHAKRABARTI, 2021).

2.3 Mediadores do processo inflamatório

Os indutores da resposta inflamatória levam a produção de diferentes mediadores, que agem alterando a funcionalidade de tecidos e órgãos. Os mediadores podem ter origem em proteínas plasmáticas ou serem secretados pelas células envolvidas na inflamação. Alguns desses mediadores encontram-se pré-formados armazenados em grânulos de mastócitos, basófilos e plaquetas, ou circulantes de forma inativa no plasma, ou ainda são produzidos na presença de estímulos. Os mediadores da via inflamatória incluem fatores imunes e quimiotáticos de diferentes fontes: as aminas vasoativas, fragmentos de componentes do Sistema Complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (ALLER et al., 2006).

No processo inflamatório, inicialmente os mastócitos, células sentinelas do sistema imune, liberam mediadores armazenados em seus grânulos, como as aminas vasoativas, exemplificadas pela histamina (FRENZEL; HERMINE, 2013). Essas substâncias provocam a vasodilatação e aumento da permeabilidade do endotélio, permitindo a saída de um conteúdo rico em proteínas. Esse efeito provoca uma alta concentração de hemácias e de leucócitos para a periferia dos vasos, seguida da sua marginalização, diapedese e migração (FRANCISCHETTI et al., 2010). As primeiras células direcionadas ao local da lesão são os leucócitos polimorfonucleares, seguidos pelos monócitos. Leucócitos ativados estimulam vias que levam a formação de mediadores inflamatórios como espécies reativas de oxigênio (ROS), mediadores lipídicos, e mediadores protéicos (AMULIC et al, 2012).

O óxido nítrico (NO) tem função disseminada em respostas inflamatórias. Em células endoteliais o NO difunde-se para células musculares lisas provocando relaxamento e vasodilatação. O estímulo à vasodilatação que ocorre no processo inflamatório, induzido por diferentes agentes flogísticos é dependente da liberação de NO (WOTHERSPOON, 2005).

Os mediadores lipídicos, os eicosanoides, possuem destaque na patogênese de várias doenças e estados inflamatórios. Os eicosanoides são formados a partir do metabolismo do ácido araquidônico, liberado a partir da degradação de lipídios da membrana, pelas vias da ciclooxigenase (COX), responsável pela síntese das prostaglandinas e tromboxanos, e a via da lipoxigenase que dá origem aos leucotrienos. Conforme a origem e função que exercem são reconhecidas três ciclooxigenases: COX-1, de ocorrência na maioria das células e associada a manutenção da homeostasia, a COX-2, indutível em células envolvidas no processo inflamatório, e a COX-3 com função ainda não totalmente estabelecida, sendo expressa em maior quantidade no córtex cerebral e coração (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

As prostaglandinas (PG) são eficientes vasodilatadores, e em sinergia com as aminas vasoativas, histamina e bradicinina, contribuem para a origem do eritema nas áreas inflamadas, além de causadoras de dor, sendo a prostaglandina E2 (PGE₂) uma molécula crítica para ativação, maturação, migração e secreção de citocinas por várias células do sistema imune inato, exercendo importante papel nas respostas a infecções por micro-organismos. Os tromboxanos induzem efeitos como vasoconstrição de arteríolas e veias, agregação plaquetária e participam de alterações nos vasos do tecido pulmonar. Já os leucotrienos, da via da lipoxigenase, estimulam a liberação das citocinas de células inflamatórias, podendo ainda causar aderência, quimiotaxia, ativação de leucócitos polimorfonucleares e estímulo a proliferação de macrófagos e linfócitos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; AGARD; ASAKRAH; MORICI, 2013; DENNIS; NORRIS, 2015).

Outros mediadores importantes do processo inflamatório são as citocinas, que correspondem a mediadores protéicos, sintetizados por células nucleadas, dentre estas, as do sistema imune. As citocinas participam da resposta inflamatória por meio de ações diretas sobre as células, ou induzindo a formação de outras citocinas, amplificando a resposta, pela indução da expressão de receptores protéicos, e ainda podem exercer ações sinérgicas ou antagônicas com outras citocinas. Conforme suas atividades biológicas podem ser agrupadas em diferentes classes, como interferon, interleucinas e fator de necrose tumoral. Além disso, de acordo com o papel que exercem na inflamação, com ou sem infecção, essas proteínas podem ser classificadas como pró-inflamatórias, por promoverem a inflamação, citocinas

anti-inflamatórias que suprimem a atividade das pró-inflamatórias, ou apresentar natureza pleiotrópica, com habilidade de mediar respostas inflamatórias e protetoras (DINARELLO, 2001; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; FAJGENBAUM; JUNE, 2020).

As citocinas pró-inflamatórias, envolvidas na resposta inicial do sistema imune, são liberadas por macrófagos e outras células do sistema e podem desencadear liberação de citocinas secundárias (CAVAILLON, 2001; KRAYCHETE et al., 2006). Essas citocinas são consideradas pró-inflamatórias pois são eficazes na expressão de genes inflamatórios, promovendo a cascata de mediadores inflamatórios. As citocinas interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) são fortemente eficazes na produção de estímulos desses genes. O TNF- α induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-6), a resposta oxidativa, produção de prostaglandinas, ativação dos mediadores envolvidos na cascata de coagulação e apoptose celular, além de provocar a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que amplificam a resposta inflamatória pela ativação de outros mediadores (DINARELLO, 2001; ULLOA; TRACEY, 2005; MILLER et al., 2009; DINARELLO, 2019).

Já as citocinas anti-inflamatórias ou imunorregulatórias, bloqueiam o processo de síntese de mediadores inflamatórios ou suprimem a intensidade da cascata inflamatória. Dessa forma, evitam respostas hiperativas em infecções patogênicas ou causadas por outros estímulos. Citocinas como IL-10, fator de crescimento transformante (TGF- β) e IL-37 suprimem a expressão de citocinas pró-inflamatórias (MUNROE et al., 2010; CAVALLI; DINARELLO, 2017; OUYANG; O’GARRA, 2019). A citocina IL-2, alvo de pesquisas para tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, possui, entre outras ações, capacidade de manter a proliferação homeostática de células Treg, -portanto considerada por alguns autores anti-inflamatória- e modular diferenciação de células T efectoras e de monócitos (MITRA; LEONARD, 2018).

O subgrupo das quimiocinas são secretados por leucócitos e células endoteliais como resposta a dano tecidual ou por ação de outros mediadores, exercendo função no controle da migração leucocitária, quimiotaxia (ALLER et al., 2006). Por exercerem importância central nos processos de migração de leucócitos, as quimiocinas auxiliam na homeostase do sistema imune, estando envolvidas em todas as respostas imunes e inflamatórias, sejam estas protetoras ou efectoras (HUGHES; NIBBS, 2018).

2.4 Resposta inflamatória e envenenamento ofídico

Os venenos ofídicos são constituídos por uma mistura complexa de toxinas que são injetadas em suas vítimas ou presas, através de um órgão inoculador, para defesa ou predação.

Essas toxinas, possuem uma grande variedade de moléculas na composição química, incluindo peptídeos, proteínas, aminas biogênicas, polissacarídeos e lipídios, com alta especificidade para alvos em diversos tecidos. Conforme a presença do órgão inoculador de veneno, as serpentes podem ser classificadas em peçonhentas e não-peçonhentas. As serpentes peçonhentas estão distribuídas em quatro famílias principais: Viperidae, Elapidae, Atractaspididae e Colubridae, cujos venenos possuem uma ampla diversidade de atividades biológicas (ROY, 2021).

A família Viperidae se destaca por serpentes de importância médica, responsáveis pela grande maioria dos casos de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WHO 2007; 2017). Da mesma forma, a subfamília Crotalinae possui ampla diversidade e distribuição, sendo o envenenamento causado por estas serpentes caracterizado, em geral, por intensos efeitos locais e sistêmicos (ALENCAR et al., 2016). Nesse contexto, a resposta inflamatória é bem reconhecida como desencadeadora da toxicidade local e sistêmica induzida pelo veneno das serpentes dessa subfamília.

No Brasil, a subfamília Crotalinae compreende os gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrocophias*, que são responsáveis pela maior parte dos acidentes por animais peçonhentos registrados no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2018). Os venenos das espécies pertencentes ao gênero *Bothrops*, consistem em um coquetel de toxinas que, por sua vez, induzem eventos inflamatórios grosseiros, com alta migração leucocitária e liberação de uma rede complexa de mediadores inflamatórios (TEIXEIRA et al., 2019). Dependendo da constituição e volume do veneno injetado, esses eventos inflamatórios podem evoluir para a resolução, ou quadros clínicos mais leves, ou para uma resposta inflamatória excessiva e descontrolada, com maior gravidade clínica da vítima (IBIAPINA et al., 2019; MOURA-DA-SILVA et al., 2020).

Entre os componentes do veneno estão as metaloproteinases, fosfolipases A₂, serinaproteases, que são apontados como os principais constituintes do veneno do gênero *Bothrops* sp. (SOUZA et al., 2013). A constituição do veneno de espécies botrópicas pode apresentar variações interespecie, intraespecie e, inclusive sofrer influência da idade, do sexo e da dieta (CALVETE et al., 2011; SOUZA et al., 2013; AMAZONAS et al., 2018). O edema local intenso é um importante achado clínico nos acidentados por serpentes deste gênero, podendo evoluir para isquemia e compressão neural, síndrome compartimental e necrose (CARDOSO et al., 1993; JORGE et al., 1999).

Vários estudos têm demonstrado que o edema causado pelos venenos botrópicos são dependentes da liberação local de mediadores inflamatórios, que em sinergia desencadeiam

aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, sendo demonstrado em modelos experimentais o papel das aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária, prostaglandinas e derivados das vias das ciclooxygenase 1 e 2, óxido nítrico, mediadores adrenérgicos, componentes do Sistema Complemento, citocinas e quimiocinas (CHAVES; BARROS; GUTIERREZ, 1995; RODRIGUES et al., 2004; ESCOCARD et al., 2006; OLIVO et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2010; PIEDE-QUEIROZ et al., 2010; MOREIRA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2019). Foi demonstrado ainda, em estudos realizados com vítimas de envenenamentos, a participação de citocinas e quimiocinas na resposta inflamatória local e sistêmica (AVILA-AGUERO et al., 2001; IBIAPINA et al., 2019; WELLMANN et al., 2020; NEVES et al., 2022).

Estudos experimentais têm sugerido que os venenos das serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* sp. induzem aumento de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 no local da injeção (BARROS et al., 1998; ZAMUNER et al., 2005; MOREIRA et al., 2012; ECHEVERRÍA et al., 2018). Da mesma forma, estudos clínicos demonstraram a detecção de níveis aumentados de TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 e IL-17 em amostras de pacientes picados por espécies botrópicas, sendo a citocina IL-6 associada à maior gravidade dos casos de acidentes por *Bothrops atrox* (AVILA-AGUERO et al., 2001; IBIAPINA et al., 2019; WELLMANN et al., 2020; NEVES et al., 2022).

Já o estresse oxidativo provocado pelos venenos botrópicos está relacionado à sua capacidade de estimular funções leucocitárias com produção de substâncias microbidas e atividade fagocítica. Em modelo experimental foi observado a produção ROS por macrófagos e leucócitos peritoneais induzido pelo veneno de espécies do gênero *Bothrops* (SETUBAL et al., 2011; 2013). Além disso, um estudo que avaliou vítimas de acidentes ofídicos após admissão hospitalar e após um mês, demonstrou um aumento significativo do estresse oxidativo nesses pacientes e sua persistência a após um mês do acidente, demonstrando sua relevância na fisiopatologia da picada e possivelmente em complicações secundárias (ZENGIN et al., 2014).

Os componentes do veneno ativam e estimulam as células da resposta imune por diferentes mecanismos. Toxinas como as fosfolipases A₂ e as metaloproteinases presentes nos venenos de serpentes exercem influência direta sobre os macrófagos residentes nos tecidos, ativando-os e induzindo ação fagocitária e geração de mediadores inflamatórios (ZULIANI et al., 2005; LEIGUEZ et al., 2011; SETÚBAL et al., 2011; FURTADO et al., 2014; MOREIRA et al., 2020).

Além das toxinas injetadas, a serpente possui micro-organismos em sua cavidade oral que também são inoculados, no momento da picada, e atingem os tecidos contribuindo para desencadeamento das manifestações locais e sistêmicas do veneno (JORGE et al., 1994; SACHETT et al., 2017; RESIERE et al., 2020). O dano tecidual causado por essas toxinas somado a infecção local favorece a progressão do dano local observada nos acidentes com serpentes (SARAVIA-OTTEN et al., 2007; RUCAVADO et al., 2016).

O mecanismo celular desencadeador da resposta imune ao envenenamento ofídico está relacionado ao reconhecimento por receptores de superfície e do citosol, expressos em células imunes inatas, os PRR. Embora poucos estudos demonstrem a ação de PRR no envenenamento, os TLR são bem reconhecidos como primordiais nesse processo de resposta inicial. Esses receptores podem reconhecer diferentes moléculas que são liberadas no envenenamento, sendo estas os PAMP, DAMP e padrões moleculares associados a veneno (VAMP), com alta sensibilidade e especificidade. Ao detectar essas moléculas, os receptores celulares de células teciduais residentes desencadeiam vias de sinalização, que levam a transcrição de genes relacionados à síntese de mediadores inflamatórios (MEDZHITOV, 2010; ZOCCAL et al., 2014; MOREIRA et al., 2016).

2.5 Estudo do processo inflamatório baseado em modelos experimentais

Diante do entendimento dos mecanismos moleculares da resposta inflamatória, novos sistemas de testes *in vitro* foram estabelecidos para a pesquisa de substâncias a fim de identificar novos compostos anti-inflamatórios (CARVALHO, 2004). Vários ensaios *in vitro* são utilizados para testar a propriedade anti-inflamatória, dentre esses, ensaios em cultivo celular. O cultivo de células foi uma técnica desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em que é possível mantê-las em um meio ambiente controlado (ALVES; GUIMARÃES, 2013).

Uma das formas de estudo das propriedades anti-inflamatórias de diferentes compostos *in vitro* é pelo ensaio de ativação de macrófagos. A aplicação dessa técnica é baseada na exposição da cultura celular a um determinado agente patogênico, comumente utilizado o lipopolissarídeo (LPS), obtido da parede de células bacterianas Gram-negativas. O LPS se liga ao TLR-4 e demais moléculas de membrana do macrófago induzindo a sua ativação. Neste contexto, o macrófago no estado ativado sofre mudanças bioquímicas e alterações na expressão de genes, causado por estímulos à membrana macrofágica, além de alterações em suas propriedades de locomoção, aderência, fagocitose, e síntese de enzimas e substâncias antimicrobianas, citotóxicas, pró-inflamatórias, vasodilatadoras e

imunomoduladoras (SELIGMANN, 2003). Progressivamente, como resposta à ativação por mediadores inflamatórios, essas células aumentam o seu conteúdo enzimático e a liberação de compostos biológicos ativos para o meio extracelular. Entre os produtos secretados estão as citocinas, ROS, incluindo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o NO (FRIEDL et al., 2004). Assim, é possível realizar a pesquisas de substâncias quanto a sua capacidade de inibir ou ativar a produção de compostos pró-inflamatórios.

Os modelos *in vivo* de inflamação, apesar da dificuldade no controle das condições do meio ambiente, são ótimas ferramentas para o estudo do papel biológico de substâncias anti-inflamatórias, uma vez que permite a investigação simultânea de células e mediadores que interagem durante o processo inflamatório. Além disso, novas técnicas da biotecnologia têm permitido a obtenção de modelos animais transgênicos, que possibilitam a determinação da contribuição *in vivo* de moléculas específicas envolvidas na defesa do hospedeiro (KNAPP, 2009). Uma técnica comum para avaliação do potencial anti-inflamatório de compostos químicos, incluindo os de origem vegetal, é o edema de pata. A técnica consiste na avaliação da capacidade do composto de inibir o edema induzido na pata traseira de animais por injeção de agentes flogísticos (YAMAKAWA et al., 1976; LE BARS et al., 2001).

2.6 O uso de plantas medicinais com propriedades anti-inflamatórias

A resposta inflamatória é uma importante ferramenta de defesa do organismo, porém, se ocorrer de forma exacerbada, pode desencadear diversas condições patológicas (ASHLEY et al., 2012). Dessa forma, compostos anti-inflamatórios podem ser usados para regular ou suprimir a inflamação. Em alternativa aos medicamentos anti-inflamatórios atualmente disponíveis, como anti-inflamatórios esteroidais, corticoides, e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que apresentam efeitos colaterais adversos, estão os produtos de origem vegetal, apontados como fontes de novos agentes terapêuticos. Nesse sentido, a fitoterapia é um dos aspectos mais importantes da medicina complementar, para o tratamento da resposta inflamatória.

A partir do conhecimento dos mecanismos moleculares que levam à inflamação, alguns trabalhos, usando modelos de inflamação *in vitro* e *in vivo*, sugerem o potencial da fitoterapia na melhora ou bloqueio de eventos que desencadeiam doenças inflamatórias. Dessa forma, numerosas espécies vegetais são apontadas com potencial anti-inflamatório, entre elas o Crajiru (*Arrabidaea chica* VERLOT), e suas propriedades podem ser baseadas em uso

tradicional ou devidamente avaliados em estudos experimentais e clínicos (SULTANA; SAIIFY 2012; ORLIKOVA et al. 2014; UBIERA, 2021).

As propriedades anti-inflamatórias de plantas medicinais podem ser atribuídas a produtos do metabolismo secundário, que atuam sobre alvos moleculares e mediadores pró-inflamatórios em respostas inflamatórias. Os metabólitos secundários indicados como capazes de modificar a resposta inflamatória incluem: flavonoides, triperpenos, esteróides (fitoesteróis), taninos, alcaloides, sesquiterpenos, cumarinas, compostos polifenólicos, proantocianidinas, carotenos, vitamina A, E e C (IWALEWA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2018).

Normalmente, a planta inteira ou partes como raiz, caule, folhas, flores e frutas são usadas para fins medicinais no sistema tradicional. A partir de estudos com diferentes porções vegetais, foram isolados metabólitos secundários ou compostos químicos purificados, com propriedades anti-inflamatórias comprovados em ensaios pré-clínico e clínico (YATOO et al., 2018). Além disso, algumas preparações à base de plantas com atividade anti-inflamatória foram patenteadas (DARSHAN; DORESWAMY, 2004).

Diferentes mecanismos têm sido explorados para a ação anti-inflamatória das plantas, e estudos têm demonstrado diferentes vias que podem interferir. Espécies vegetais com propriedades anti-inflamatórias podem exercer efeito em um ou mais componente da cascata inflamatória ou sobre uma ou mais vias. O mecanismo geral de ação são: propriedades imunoprotetoras/ imunomoduladoras, modulando o processo fisiológico de forma a adequar o equilíbrio entre mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios. Plantas medicinais são apontadas com potencial inibidor de citocinas pró-inflamatória ou potencial supressor de células. Ação inibitória na geração de NF-kB, NO, COX, lipoxigenase (LOX), prostaglandina (PG), leucotrieno (LT), tromboxano (TX) e ROS, prevenindo o estresse oxidativo e consequentemente a indução da cascata de inflamação. Além de inibição enzimática de aminas bioativas, atividade antitrombótica, ou propriedades estabilizadoras da membrana, por exemplo, ação microbicida (IWALEWA et al., 2007).

Em revisão da literatura realizada em 2018 foram apontadas 75 espécies de plantas estudadas no Brasil com potencial anti-inflamatório (RIBEIRO et al., 2018). Essas espécies estão distribuídas em 34 famílias, dentre as quais podem ser citadas Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Apocynaceae. Das espécies estudadas, nove são nativas do Brasil: *Arrabidaea Chica* (Craijirú), *Baccharis trimera* (Carqueja), *Caesalpinia ferrea* (Pau-ferro), *Cordia verbenacea* (Erva-baleeira), *Mikania laevigata* (Guaco), *Phyllanthus niruri* (Quebra-pedra), *Schinus terebinthifolius* (Aroeira-vermelha), *Tabebuia avellanedae* (Ipê-roxo) e

Uncaria tomentosa (Unha-de-gato). Tais espécies vegetais contêm flavonoides, polifenóis, proantocianidinas, alcaloides, terpenóides e esteroides que têm propriedades anti-inflamatórias. Algumas dessas plantas estão na lista dos 71 nomes de plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde – SUS, o RENISUS, e três são disponibilizadas no SUS como fitoterápico: *Aloe vera* (Babosa), *Schinus terebenthifolius* e *Uncaria tomentosa*.

As plantas medicinais e fitoterápicos têm sido usadas para diferentes doenças e condições inflamatórias, como doenças reumáticas, doenças periodontais, colite ulcerativa, dores neurogênicas, doenças digestivas e respiratórias, doenças cardiovasculares, doenças intestinais, doenças alérgicas, cicatrização de feridas, queimaduras e lesões inflamatórias locais, por pessoas em vários países. Dentre as condições clínicas que são investigadas quanto aos efeitos anti-inflamatórios das plantas medicinais e fitoterápicos estão as ações induzidas pelo envenenamento ofídico (MAGALHÃES et al., 2011; MOURA et al., 2017; FELIX-SILVA et al., 2017). Dentre as espécies vegetais que são utilizadas na medicina tradicional, na região Amazônica, estão as do gênero *Bellucia*.

2.7 Gênero *Bellucia*

A literatura etnobotânica contém várias formas tradicionais de uso para plantas do gênero *Bellucia*, sendo o uso medicinal a forma mais frequente. São relatados o uso das espécies do gênero na medicina tradicional como antifúngico, vermífugos, antileucorréia, antiofídicos, tratamentos de abscessos e gastrite (CRUZ; KAPLAN, 2004; SATALAYA et al., 2009; LIZCANO et al., 2010; LIMA et al., 2011; VÁSQUEZ et al., 2014; MOURA et al., 2015). Apesar desses relatos, são escassos os estudos que avaliem toxicidade e que comprovem a eficácia dessas espécies no tratamento de doenças citadas no uso popular. Além das práticas medicinais relacionadas ao gênero *Bellucia*, sua madeira é muito útil para construção e seus frutos são utilizados na alimentação de humanos e outros animais (COSTA; MITJA, 2010).

Estudos fitoquímicos do gênero *Bellucia* são relatados para as espécies *B. grossularioides* e *B. pentamera* e *B. dichotoma*, sendo apontadas variações químicas consideráveis entre essas espécies. Entre as substâncias encontradas no metabolismo secundário dessas espécies está o esqualeno, que possui atividade antitumoral e imunostimulante relatadas (ISAZA et al., 2007; FOX, 2009).

A espécie *Bellucia dichotoma* é conhecida popularmente como muúba ou goiaba-de-anta e suas cascas são utilizadas com fins medicinais em populações de zona rural no interior do estado do Pará (FORERO-PINTO, 1980). Essa espécie vegetal é endêmica da região

Amazônica, com distribuição geográfica em quatro Estados da região Norte: Acre, Amazonas, Amapá e Pará (BAUMGRATZ, 2013). As plantas possuem porte médio, podendo chegar a no máximo dez metros de altura, com caule roliço e ereto e com presença de raízes tabulares na base. Em relação a casca, possui coloração castanho-clara com textura áspera e fissurada. Possui ainda a copa ampla, muito ramificada, com folhagens abundantes e perenifólias (Figura 2). Essa espécie vegetal é comumente encontrada em florestas de capoeiras ou em florestas de bordas, pastagem abandonadas e margens de estradas e ramais. Seus frutos são comestíveis, sendo apreciados por animais silvestres como antas, macacos, aves e morcegos (NETO et al., 2018).

Figura 2: Material vegetal de *Bellucia dichotoma*: A. parte aérea, B./C. inflorescência, D. parte vegetal da coleta.



Fonte: arquivos pessoais

Bellucia dichotoma é utilizada por comunidades Amazônicas para tratamento de envenenamentos por animais peçonhentos, e estudos com extrato vegetal aquoso dessa espécie tem evidenciado a atividade antiofídica frente a protocolos de estudo *in vitro* e *in vivo* (MOURA et al., 2013; MOURA et al., 2014; MOURA et al., 2015; MOURA et al., 2017). A população usa a casca no preparo de chá para uso antes de entrarem na mata, uso preventivo, e nas vítimas após acidentes ofídicos, para tratar envenenamento (MOURA et al., 2013). Da mesma forma, a avaliação da atividade antimicrobiana de *B. dichotoma*, mostrou a potencial do extrato hexânico da espécie em inibir o crescimento de bactérias comumente encontradas

na cavidade oral de serpentes do gênero *Bothrops* e associadas a infecções bacterianas secundárias a picadas de serpentes (SOUZA et al., 2021).

Em relação a sua constituição química, foram relatados como principais classes de metabólicos constituintes ácidos graxos, flavonóides, terpenos, taninos hidrolisáveis e condensados quando avaliados o extrato aquoso da casca por cromatografia em camada delgada (MOURA et al., 2013).

Para garantir a eficiência e eficácia das propriedades farmacológicas, profilática e terapêutica das plantas medicinais, estas devem ser avaliadas quanto ao mecanismo de ação, dose eficaz e segurança toxicológica. Dessa forma, trabalhos que avaliem as propriedades biológicas de plantas medicinais, a toxicidade e ofereçam uma alternativa terapêutica às doenças e agravos ainda negligenciados tornam-se importantes aliados à saúde pública.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades boqueadoras do extrato de *Bellucia dichotoma* induzidas pelo veneno da *Bothrops atrox* para o desenvolvimento de um potencial candidato a fitoterápico como recurso terapêutico alternativo ou complementar ao soro.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o acidente ofídico pela espécie *Bothrops atrox* quanto a características imunopatológicas, bem como os tratamentos, padrão e alternativo, com informações disponíveis na literatura (CAPÍTULO II);
- Realizar um levantamento na literatura científica sobre a disponibilidade da fitoterapia no sistema único de saúde brasileiro (CAPÍTULO III);
- Avaliar o potencial de bloqueio do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* sobre mediadores inflamatórios, induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox*, e sua propriedade cicatrizante (CAPÍTULO IV);
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* (CAPÍTULO V);
- Desenvolver e caracterizar uma forma farmacêutica sólida, granulado efervescente, à base de *Bellucia dichotoma* para uso oral (CAPÍTULO V);
- Avaliar a eficácia da forma farmacêutica obtida em bloquear a atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* (CAPÍTULO V).

Referências Bibliográficas

- AGARD, M.; ASAKRAH, S.; MORICI, L. A. PGE₂ suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 45, p. 1–11, 2013.
- ALENCAR, R. V.; QUENTAL, T.B.; GRAZZIOTIN, F. G.; ALFARO, M. L.; MARTINS, M.; VENZON, M.; ZAHER, H. Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 105, p. 50–62, 2016.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, n. 10, p. 225–234, 2006.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. Cultivo celular. In Molinaro E, Caputo L, Amendoeira R. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de Saúde**: v. 3. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2013.
- AMAZONAS, D. R.; PORTES-JUNIOR, J. A.; NISHIYAMA-JR, M. Y.; NICOLAU, C. A.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H.; GRAZZIOTIN, F. G.; ROKYTA, D. R.; GIBBS, H. L.; VALENTE, R. H.; JUNQUEIRA-AZEVEDO, I. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. **Journal Proteomic**, v. 181, p. 60–72, 2018.
- AMULIC B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**, v 30, p. 459-489, 2012.
- ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review Ecology, Evolution and Systematics**, v. 43, p. 385–406, 2012.
- AVILA-AGUERO, M. L.; PARIS, M. M.; HU, S.; PETERSON, P. K.; GURIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. **Pediatric Emergency Care**, v. 17, n. 6, p. 425–429, 2001.
- BARROS, S. F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V. L, KIPNIS, T. L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators Inflammation**, v. 7, p. 339–46, 1998.
- BASU A.; RAMAMOORTHY, G.; ALBERT, G.; GALLEN, C.; BEYER, A.; SNYDER, C.; KOSKI, G.; DISIS, M. L.; CZERNIECKI, B. J.; KODUMUDI, K. Differentiation and Regulation of T_H Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v.12, p. 1–25, 2021.
- BAUMGRATZ, J. F. Lista de espécies da flora do Brasil: *Bellucia dichotoma*. Disponível em: <http://www.reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23691>.
- CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PEREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; GUTIERREZ, J. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H.; FURTADO, M.

- F.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: pedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal Proteome**, v.74, n. 4, p. 510–527, 2011.
- CAO, X. Self-regulation and cross-regulation of pattern- recognition receptor signalling in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v.16, n. 1, p. 35–50, 2016.
- CARDOSO J. L.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O.; JORGE, M. T.; LEITE, R. P.; NISHIOKA, S. A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, S. C.; TOMY, L.; SANTORO, A. M.; CHUDZINSKI, A. M.; CASTRO, S. C.; KAMICUTI, A.S.; KELEN, E. M.; HIRATA, M. H.; MIRANDOLA, R.M.; THEAKSTON, R. D.; WARREL, D. A. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 86, n. 5, p. 315–325, 1993.
- CARVALHO, J. C. **Constituintes de plantas com atividade anti-inflamatória**. In: Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmedd, 2004.
- CAVAILLON, J. M. Pro-versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. **Cellular and Molecular Biology**, v. 47, n. 4, p. 695–702, 2001.
- CAVALLI, G.; DINARELLO, C. Suppression of inflammation and acquired immunity by IL-37. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p.179–190, 2018.
- CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIERREZ, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice. **Toxicon**, v. 33, n. 1, p. 31–39, 1995.
- CERBONI, S.; GEHRMANN, U.; PREITE, S.; MITRA, S. Cytokine-regulated Th17 plasticity in human health and diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 3–18, 2020.
- CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Review Immunology**, v. 10, n.12, p. 826–837, 2010.
- COSTA, J. R.; MITJA, D. Use of vegetal resources by family farmers in Manacapuru, Amazonas state. **Acta Amazonia**, v. 40, n. 1, p. 49-58, 2010.
- CRUZ, A. V.; KAPLAN, M. A. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no brasil. **Revista Floresta Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.
- DARSHAN S, DORESWAMY R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 5, p. 343-57, 2004.
- DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 511–523, 2015.
- DINARELLO, C. A. Anti-Cytokine Therapies in Response to Systemic Infection. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 6, n. 3, p. 244-250, 2001.

- DINARELLO, C. A. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 612–632, 2019.
- DONG, C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. **Annual Review Immunology**, v. 39, p. 51-76, 2021.
- ECHEVERRÍA S.; LEIGUEZ, E.; GUIJAS, C.; NASCIMENTO, N. G.; ACOSTA, O.; TEIXEIRA, C.; LEIVA, L. C.; RODRIGUEZ, J. P. Evaluation of pro-inflammatory events induced by *Bothrops alternatus* snake venom. **Chemico-Biological Interactions**, v. 281, p. 24–31, 2018.
- ERBEL, C.; WOLF, A.; LASITSCHKA, F.; LINDEN, F.; DOMSCHKE, G.; AKKAVANPOOR, M.; DOESCH, A. O.; KATUS, H. A.; GLEISSNER, C. Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability. **International Journal of Cardiology**, v.186, p. 219–225, 2015.
- ESCOCARD, R. C.; KANASHIRO, M. M.; PETRETSKI, J. H.; AZEVEDO-SILVA, J.; QUEIROZ-DE-CARVALHO, E. C. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Immunobiology**, v. 211, n. 1-2, p. 37–43, 2006.
- FAJGENBAUM, D.; JUNE, A. Cytokine Storm. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2255–2273, 2020.
- FÉLIX-SILVA, J.; SILVA-JUNIOR, A.; ZUCOLOTTI, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. 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, p. 1–52, 2017.
- FORERO, E. Connaraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro, 1983. Disponível em: < <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16929> >. Acesso em: 07.07.2022.
- FOX, C. B. Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3286–3312, 2009.
- FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W. B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 25, n. 4, p. 575–584, 2010.
- FRENZEL, L.; HERMINE, O. Mast cells and inflammation. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 2, p. 141–145, 2013.
- FRIEDL, R.; THOMAS, M.; KOPP, B.; GERHARD, P.S. Stimulation of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of *Panax ginseng* root in Raw 264.7 cells. **Pharmacology**, v. 34, p. 1663–1670, 2004.
- FURTADO, J. L.; OLIVEIRA, G. A.; PONTES, A. S.; SETUBAL, S. S.; XAVIER, C. V.; LACOUTH-SILVA, F.; LIMA, B. F.; ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; CALDERON, L.

- A.; STABELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. Activation of J77A.1 macrophages by three phospholipases A₂ isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, 2014.
- GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448–454, 1999.
- GERMOLEC, D. R.; SHIPKOWSKI, K. A.; FRAWLEY, R. P.; EVANS, E. Markers of Inflammation. **Methods in Molecular Biology**, v. 1803, p. 57–79, 2018.
- GONG, T.; LIU, L.; JIANG, W.; ZHOU, R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 2, p. 95–112, 2020.
- HRISTODOROV, D.; MLADENOV, R.; HUHN, M.; BARTH, S.; THEPEN, T. Macrophage-Targeted Therapy: CD64-Based Immunotoxins for Treatment of Chronic Inflammatory Diseases. **Toxins**, v. 4, n. 9, p. 676–694, 2012.
- HUGHES, C. E.; NIBBS, R. J. A guide to chemokines and their receptors. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 16, p. 2944–2971, 2018.
- IBIAPINA, H. N.; COSTA, A. G.; SACHETT, J. A.; SILVA, I. M.; TARRAGO, A. M.; NEVES, J. C.; KERR, M. W.; SANTANA, M. F.; MARTINS-FILHOS, O. A.; LACERDA, M. V.; FERREIRA, L. C.; MALHEIRO, A.; MONTEIRO, W. M. An immunological stairway to severe tissue complication assembly in *Bothrops atrox* snakebites. **Frontier in Immunology**, v. 10, n. 1882, p. 1–13, 2019.
- ISAZA, M. A.; OROSKO, J. H.; ZULETA, L. M.; RIVERA, D. A.; TAPIAS, I. L. Perfíles cromatográficos preliminares por GC-MS de especies de plantas Melastomatáceas. **Science Technica**, v. 33, n. 33, p. 359–362, 2007.
- IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 25, p. 2868–2885, 2007.
- JIANG, Q.; YANG, G.; XIAO, F.; XIE, J.; WANG, S.; LU, L.; CUI, D. Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1–14, 2021.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A.; DA SILVA, M. L.; KUSANO, E. J.; DE MENDONÇA, J. S. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: a prospective study. **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 743–748, 1994.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A.; O’CONNELL, J. L. Prognostic factors for amputation in the case of envenoming by snakes of the *Bothrops* genus (*Viperidae*). **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 93, n. 4, p. 401–418, 1999.
- KAUR, B. P.; SECORD, E. Innate Immunity. **Pediatric Clinics of North America**, v. 66, p. 905–911, 2019.

KNAPP, S. LPS and bacterial lung inflammation models. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 6, n. 4, p. 113–118, 2009.

KERVEVAN J, CHAKRABARTI L. Role of CD4+ T Cells in the Control of Viral Infections: Recent Advances and Open Questions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 523, p. 1–23, 2021.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 159–175, 2013.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T.; VALENTE, C. M. Pro-inflammatory cytokines and pain. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 3, p. 199–206, 2006.

KUMAR, S.; JEONG, Y.; ASHRAF, M. U.; BAE, Y. Dendritic Cell-Mediated Th2 Immunity and Immune Disorders. **International Journal Molecular Science**, v. 20, n. 2159, p. 1–28, 2019.

KUPRASH, D. V.; NEDOPASOV, S. A. Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation. **Biochemistry**, v. 81, n. 11, p. 1237–1239, 2016.

LAND, W. Allograft injury mediated by reactive oxygen species: from conserved proteins of *Drosophila* to acute and chronic rejection of human transplants. Part III: interaction of (oxidative) stress-induced heat shock proteins with Toll-like receptor-bearing cells of innate immunity and its consequences for the development of acute and chronic allograft rejection. **Transplantation Reviews**, v. 17, n. 2, p. 67–86, 2003.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 597–652, 2001.

LEIGUEZ, E.; ZULIANI, J. P.; CIANCIARULLO, A. M.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. A group IIA-secreted phospholipase A2 from snake venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A2 and distinct signaling pathways. **Journal Leukocyte Biology**, v. 90, n. 1, p. 155–166, 2011.

LIZCANO, L. J.; BAKKALI, F.; RUIZ-LARREA, M. B.; RUIZ-SAINZ, J. I. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1566–1570, 2010.

LIMA, P. G.; COELHO-FERREIRA, M.; OLIVEIRA, R. Medicinal plants on public fairs and markets of sustainable forest district of BR-163, state of Pará, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 422–434, 2011.

LOCATI, M.; CURTALE, G.; MANTOVANI, A. Diversity, Mechanisms and Significance of Macrophage Plasticity. **Annual Review Pathology**, v. 24, n. 15, p. 123–147, 2020.

MAGALHÃES, A.; SANTOS, G. B.; VERDAM, M. C.; FRAPORTI, L.; MALHEIRO, A.; LIMA, E. S.; DOS-SANTOS, M. C. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 1, p. 82–88, 2011.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v. 91, p. 295–298, 1997.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, p. 819–826, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–435, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n.6, p. 771–776, 2010.

MENKIN, V.; WARNER, C. R. Studies on Inflammation: XIII. Carbohydrate Metabolism, Local Acidosis, and the Cytological Picture in Inflammation. **American Journal Pathology**, v.13, n. 1, p. 25–44, 1937.

MILLER, R. J.; JUNG, H.; BHANGOO, S. K.; WHITE, F. A. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 194, p. 417–449, 2009.

MITRA, S.; LEONARD, W. Biology of IL-2 and its therapeutic modulation: Mechanisms and strategies. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, p. 643–655, 2018.

MOREIRA, V.; SDOS-ANTOS, M. C.; NASCIMENTO, N. G.; DA SILVA, H. B.; FERNANDES, C. M.; LIMA, M. R.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12-20, 2012.

MOREIRA, V.; TEIXEIRA, C.; BORGES DA SILVA, H.; D'IMPERIO LIMA, M. R.; DOS-SANTOS, M. C. The role of TLR2 in the acute inflammatory response induced by *Bothrops atrox* snake venom. **Toxicon**, v. 118, p. 121–128, 2016.

MOREIRA, V.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; VINOLO, M. A.; CURI, R.; LAMBEAU, G.; TEIXEIRA, C. 12-HETE is a regulator of PGE₂ production via COX-2 expression induced by a snake venom group IIA phospholipase A₂ in isolated peritoneal macrophages. **Chemico-Biological Interactions**, v. 317, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108903>.

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

MOURA, V. M.; BEZERRA, A. N.; MOURÃO, R. H.; LAMEIRAS, J. L.; RAPOSO, J. D.; SOUSA, R. L.; BOECHAT, A. L.; OLIVEIRA, R. B.; CHALKIDIS, H. M.; DOS-SANTOS, M. C. A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. **Toxicon**, v. 85, p. 59–68, 2014.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A.; DOS-SANTOS, M. C.; RAPOSO, J. D.; LIMA, A. E.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, M. N.; MOURÃO, R. H. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 224-232, 2015.

MOURA, V. M.; SOUZA, L. Y.; GUIMARÃES, N. C.; SANTOS, I. G.; ALMEIDA, P. D.; OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H.; DOS-SANTOS, M. C. The potential of aqueous extracts of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of *Bothrops atrox* venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 196, p. 168–177, 2017.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; CONTRERAS-BERNAL, J. C.; GIMENES, S. N.; FREITAS-DE-SOUZA, L. A.; PORTES-JR, J. A.; PEIXOTO, P. S.; IWAI, L. K.; MOURA, V. M.; BISNETO, P. F.; LACERDA, M.; SILVA, I. M.; FERREIRA, L. C.; OLIVEIRA, S. S.; WEN, F. H.; SACHETT, J. A.; MONTEIRO, W. M. The relationship between clinics and the venom of the causative amazon pit viper (*Bothrops atrox*). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, p. 1–17, 2020.

MUNROE, M. E.; BUSINGA, T. R.; KLINE, J. N.; BISHOP, G. A. Anti-inflammatory effects of the neurotransmitter agonist honokiol in a mouse model of allergic asthma. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5586–5597, 2010.

NASCIMENTO, N. G.; SAMPAIO, M. C.; AMARAL, O. R.; TEIXEIRA, C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 343–52, 2010.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, p. 319–26, 1987.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846–852, 2002.

NEVES, J. C.; IBIAPINA, H. N.; GAMA, F. M.; SACHETT, J. A.; SILVA, I. M.; COELHO, K. F.; ALVES, E. C.; TARRAGO, A. M.; FERREIRA L. C.; MALHEIRO, A. MONTEIRO, W.; COSTA, A. G. CCL-2 and CXCL-8: Potential Prognostic Biomarkers of Acute Kidney Injury after a *Bothrops atrox* Snakebite. **Mediators of Inflammation**, v. 2022, p. 1–14, 2022.

OLIVO, R. A.; TEIXEIRA, C.; WALLACE, J. L.; GUTIÉRREZ, J. M.; ZAMUNER, S. R. Role of cyclooxygenases in edema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 670–677, 2007.

ORLIKOVA, B.; LEGRAND, N.; PANNING, J.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Anti-inflammatory and anticancer drugs from nature. **Cancer Treatment Research**, v. 159, p.123–143, 2014.

OUYANG, W.; O’GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, v. 50, p. 971–891, 2019.

PIEDE-QUEIROZ, G.; FURTADO, M. F.; FIGUEIRAS, C.; PESSOA, L. A.; SPADAFORA-FERREIRA, M.; BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 2537–2544, 2010.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259–270, 2009.

RANKIN, J. A. Biological Mediators of Acute Inflammation. **AACN Clinical issues**, v. 15, n. 1, p. 3–17, 2004.

RESIERE, D.; MEHDAOUI, H.; NEVIERE, R.; OLIVE, C.; SEVERYNS, M.; BEAUDOIN, A.; FLORETIN, J.; BROUSTER, Y.; BANIDEEN, N.; CABIE, A.; MEGARBANE, B.; GURIERREZ, J. M.; KELEL, H. Infectious complications following snakebite by *Bothrops lanceolatus* in Martinique: a case series. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 1, p. 232–240, 2020.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M. A.; BASTOS, J. K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review, **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.

RODRIGUES, F. G.; PETRETSKI, J. H.; KANASHIRO, M. M.; LEMOS, L.; DA SILVA W. D.; KIPNIS, T. L. The complement system is involved in acute inflammation, but not in the hemorrhage produced by *Bothrops atrox* snake venom low molecular mass proteinase. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 10, p. 1149–1156, 2004.

ROY, B. A systematic review on snake venom and its therapeutic implication. **Journal of Emerging Technologies and Innovative Research**, v. 8, n. 7, p. 477–487, 2021.

RUCAVADO, A.; NICOLAU, C. A.; ESCALANTE, T.; KIM, J.; HERRERA, C.; GUTIERREZ, J. M.; FOX, J. W. Viperid envenomation wound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. **Toxins**, v. 8, n. 349, p. 1–13 2016.

RUYTINX, P.; PROOST, P.; DAMME, J. V.; STRYF, S. Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1930, p. 1–12, 2018.

SACHETT, J. A.; SILVA, I. M.; ALES, E. C.; OLIVEIRA, S. S.; SAMPAIO, V.; VALE, F. F.; ROMERO, G. A.; SANTOS, M. C.; MARQUES, H. O.; COLOMBINI, M.; SILVA, A. M.; WEN, F. H.; LACERDA, M. V.; MONTEIRO, W. M.; FERREIRA, L. C. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from *Bothrops* snakebites in the Brazilian amazon: a randomized controlled clinical trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–21, 2017.

SALLUSTO, F. Heterogeneity of Human CD4⁺ T Cells Against Microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 34, p. 317–334, 2016.

SARAVIA-OTTEN, P.; GUTIERREZ, J. M.; ARVIDSON, S.; THELESTAM, M.; FLOCK, J. I. Increased infectivity of *Staphylococcus aureus* in an experimental model of snake venom-induced tissue damage. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 5, p. 748–754, 2007.

SATALAYA, R. J. ROJAS, U. J.; RIOS, B.; GRANDEZ, M.; RENGIFO, E.; RUIZ, G. Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de la Amazonía Peruana. **Biofarbo**, v. 17, n. 2, p. 23–31, 2009.

SCHETT, G.; NEURATH, M. F. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. **Nature Communications**, v. 9, n. 3261, p. 1–8, 2018.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191–1197, 2005.

SELIGMANN, I. C. The Anticancer Homeopathic Composite Canova Method is not Genotoxic for Human Lymphocytes *in vitro*. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 2, p. 36 – 42, 2003.

SETUBAL, S. S.; PONTES, A. S.; FURTADO, J. L.; KAYANO, A. M.; STABELI, R. G.; ZULIANI, J. P. Effect of *Bothrops alternatus* snake venom on macrophage phagocytosis and superoxide production: participation of protein kinase C. **Journal of Venomous Animals Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 430–441, 2011.

SETUBAL, S. S.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; BASTOS, J. S.; CASTRO, O. B.; PIRES, W. L.; ZAQUERO, K. D.; CALDERON, L. A.; STABELI, R.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Effect of *Bothrops bilineata* snake venom on neutrophil function. **Toxicon**, v. 76, p. 143–149, 2013.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004

SOTO-HEREDERO, G.; GÓMEZ, M. M.; GABANDÉ-RODRÍGUEZ, E.; OLLER, J.; MITTELBRUNN, M. Glycolysis – a key player in the inflammatory response. **The FEBS Journal**, v. 287, n. 16, p. 3350–3369, 2020.

SPITE, M.; SERHAN, C. N. Novel Lipid Mediators Promote Resolution of Acute Inflammation Impact of Aspirin and Statins. **Circulation Research**, v. 107, n. 10, p. 1170–1184, 2010.

SOUZA, L. F. NICOLAU, C.; PEIXOTO, P. S.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PORTES-JUNIOR, J. A.; MOURÃO, R. H.; LIMA, I.; SANO-MARTINS, I.; CHALKIDIS, H. M.; VANTENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. 1–16, 2013.

SOUZA, M.C.; MOURA, V. M.; MOURÃO, R. H.; FACHIN-ESPINAR, M. T.; NUNEZ, C. V.; DOS-SANTOS, M. C. Antimicrobial activity of Amazonian plant species against the causative agents of secondary infection in snakebites. **Revista Fitos**, v. 15, n. 3, p. 280–297, 2021.

SULTANA, N.; SAIFY, Z.S. Naturally occurring and synthetic agents as potential anti-inflammatory and immunomodulants. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 3–19, 2012.

TAAMS, L. S. Inflamação e resolução imunológica. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 193, n. 1, p. 1–4.

TAPPER, H. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, p. 613–622, 1996.

TEIXEIRA, C.; FERNANDES, C. M.; LEIGUEZ, E.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Inflammation Induced by Platelet-Activating Viperid snake venoms: perspectives on thromboinflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2082, p. 1–13, 2019.

UBIERI, R. D. **Adenosine Dependent Anti-inflammatory Effects of *Arrabidaea chica* VERLOT**. 2021. 80 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2021.

ULLOA, L.; TRACEY, K. J. The “cytokine profile”: a code for sepsis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 56–63, 2005.

VÁSQUEZ, S. P.; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Ethnobotany of medicinal plants in riverine communities of the Municipality of Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonia** v. 44, n. 4, p. 457–472, 2014.

WELLMANN, I. A.; IBIAPINA, H. N.; SILVA, I. M.; OLIVEIRA, S. S.; TARRAGO, A. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LACERDA, M. V.; FERREIRA, L. C.; MALHEIRO, A.; MONTEIRO, W.; COSTA, A. G. Correlating Fibrinogen Consumption and Profiles of Inflammatory Molecules in Human Envenomation's by *Bothrops atrox* in the Brazilian Amazon. **Frontier Immunology**, v. 11, n. 1874, p. 1–12, 2020.

WANG, W.; SUNG, N.; GILMAN-SACHS, A.; KWAK-KIM, J. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. **Frontier Immunology**, v. 11, n. 2025, p. 1–14, 2020.

WHO, World Health Organization. (2007). **Rabies and envenomings: a neglected public health issue**: report of a consultative meeting, World Health Organization, Geneva, 10 January 2007. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43858>

WHO, World Health Organization. Technical Report Series, N. 1004 (2017). Annex 5/Appendix 1 Worldwide. **Distribution of Medically Important Venomous Snakes**. Available online at: https://www.who.int/bloodproducts/AntivenomGLrevWHO_TRS_1004_web_Annex_5.pdf

WOTHERSPOON, F.; BROWNE, D. L.; MEEKING, D. R.; MUNDAY, L. J.; SHAW, K. M.; CUMMINGS, M. H. The contributions of nitric and vasodilator prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 22, n. 6, p. 697–702, 2005.

YATOO, M. I. Anti-inflammatory drugs and herbs with special emphasis on herbal medicines for countering inflammatory diseases and disorders – A Review. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 12, n. 1, p. 39–58, 2018.

YAMAKAWA, S. A., NOZAKI, M., HOKAWA, Z. Fractionation of sakishima- habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractins. **Animal, Plant and Microbial Toxins**, vol. 1, p. 97–109, 1976.

ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 806–813, 2005.

ZENGİN, S.; AL, B.; YARBİL, P.; GUZEL, R.; ORKMEZ, M.; YOLDIRIM, C.; TAYSI, S. An assessment of oxidant/antioxidant status in patients with snake envenomation. **Emergency Medicine Journal**, v. 31, n. 1, p. 48–52, 2014.

ZHENG, B.; ZHANG, J.; CHEN, H.; NIE, H.; MILLER, H.; GONG, Q.; LIU, C. T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of Schistosomiasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–13, 2020.

ZOCCAL, K. F.; BITENCOURT, C. S.; PAULA-SILVA, F. W.; SORGI, C. A.; BORDON, K. C.; ARANTES, E. C.; FACCIOLI. TLR2, TLR4 and CD14 Recognize Venom-Associated Molecular Patterns from *Tityus serrulatus* to Induce Macrophage-Derived Inflammatory Mediators. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–12, 2014.

ZHU, X.; ZHU, J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. **Internacional Journal Molecular Science**, v. 21, n. 8011, p. 2–26, 2020.

ZULIANI, J. P.; GUTIERREZ, J.M.; CASAIS E SILVA, L. L.; COCCUZZO, S.; LOMONTE, B.; PEREIRA, C. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A (2). **Toxicon**, v. 46, n. 5, p. 523–532, 2005.

CAPÍTULO II

BATISTA, L. T.; DOS SANTOS, M. C. Acidentes atribuídos à serpente *Bothrops atrox*: imunofisiopatologia e tratamento. **Scientia Amazônia**, v. 10, n.1, CB44-CB66, 2021.

Artigo Publicado na Revista Eletrônica Scientia Amazonia.



Ciências Biológicas

Acidentes atribuídos à serpente *Bothrops atrox*: Imunofisiopatologia e tratamento¹

Luana Travassos Batista^{1,2}, Maria Cristina dos Santos^{3*}

Resumo

Os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública no Brasil. Na região Amazônica para a espécie *Bothrops atrox* é atribuída a maioria dos envenenamentos registrados, segundo os dados do Ministério da Saúde. O veneno dessa espécie caracteriza-se pela presença de três principais classes de toxinas, as metaloproteínases (SMVP), as fosfolipases (PLA₂) e serinoproteases (SMSP), que induzem efeitos locais e sistêmicos em suas vítimas. Os efeitos locais induzidos pelo veneno de *B. atrox* são acentuados e incluem dor, edema, formação de bolhas e danos teciduais, que podem evoluir para necrose e perda do membro acometido. As SMVP e as PLA₂ induzem forte resposta pró-inflamatória e vários estudos demonstraram, *in vitro* e *in vivo*, os mecanismos responsáveis pelo desencadeamento dessa resposta. O tratamento padrão para envenenamentos botrópicos disponível no Brasil não é capaz de reverter de forma eficaz os efeitos locais produzidos pelo veneno, dessa forma, vítimas de acidentes ofídicos de zonas rurais da região Amazônica fazem uso de plantas medicinais, para o tratamento alternativo ou complementar dos acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* sp. Nessa revisão da literatura são abordadas as características da imunofisiopatologia dos acidentes ofídicos atribuídos à serpente *B. atrox* e os tratamentos padrão e alternativos disponíveis.

Palavras-Chave: *Bothrops atrox*, resposta imune, antivenenos, plantas antiofídicas

Accidents attributed to the *Bothrops atrox* snake: immunophysiopathology and treatment. Snakebite represents a public health problem in Brazil. In the Amazon region, *Bothrops atrox* is responsible for the majority of registered poisonings, according to data from the Ministry of Health. The venom of this species is characterized by the presence of three main classes of toxins, metalloproteinases (SMVP), phospholipases (PLA₂) and serinoproteases (SMSP), which induce local and systemic effects on their victims. The local effects induced by the *B. atrox* venom are accentuated and include pain, edema, blistering and tissue damage that can progress to necrosis and loss of the affected limb. SMVP and PLA₂ induce a strong pro-inflammatory response and several studies have demonstrated, *in vitro* and *in vivo*, the mechanisms responsible for triggering this response. The standard treatment for botropic poisonings available in Brazil is not able to effectively reverse the local effects produced by the poison, thus victims of snake accidents in rural areas of the Amazon region make use of medicinal plants, for the alternative or complementary treatment of accidents caused by snakes of the genus *Bothrops* sp. In this literature review, the characteristics of the immunophysiopathology of snakebites attributed to the snake *B. atrox* and the standard and alternative treatments available are addressed.

Keywords: *Bothrops atrox*, immune response, antivenins, anti-snakebite plants

¹ Parte de tese de doutorado na Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada/UFMA primeiro autor

² Doutoranda em Imunologia Básica e aplicada, Laboratório de Imunoquímica, ICB/UFAM, Manaus, AM, Brasil, E-mail address: lu.travassos1990@gmail.com

³ Professora Titular ICB/UFAM, Lab. de Imunoquímica, Depto Parasitologia, Manaus, Amazonas, Brasil, Correspondência eE-mail mcsantos@ufam.edu.br

1. Introdução

O acidente ofídico é caracterizado como um quadro de envenenamento decorrente da injeção de uma mistura de toxinas (veneno bruto ou peçonha) através do aparelho inoculador (presas ou dentes) de serpentes. As espécies de serpentes causadoras desses acidentes podem ser classificadas quanto a localização do aparato inoculador em: opistóglifas, proteróglifas e solenóglifas. As opistóglifas caracterizam-se por dentes inoculadores localizados na região posterior do maxilar, o que dificulta a injeção da peçonha, e são consideradas potencialmente peçonhentas, são exemplos as espécies das famílias Colubridae e Dipsadidae, exemplos, falsas-corais, a muçuranas, cobra verde, dentre outras (BRASIL, 2017; SILVA et al., 2019a).

As proteróglifas possuem dentes inoculadores de veneno fixos e pouco desenvolvidos na região anterior do maxilar e, por isso, precisam morder suas vítimas, para injetar o veneno. Essa é um tipo de dentição que ocorre somente nas corais verdadeiras, que devido a sua estrutura física são capazes apenas de morder partes estreitas do corpo das vítimas, como dedos dos pés e das mãos. Nas solenóglifas, os dentes inoculadores de veneno são muito desenvolvidos, móveis e situam-se na parte anterior do maxilar, facilitando a injeção da peçonha, é o tipo de dentição encontrado nas espécies da família Viperidae, como nas jararacas, surucucu-pico-de-jaca e cascavéis (BRASIL, 2001; BRASIL, 2017) (Figura 1).

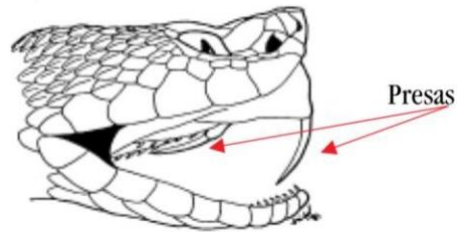


Figura 1 – Dentição solenóglifa presente em espécies da família Viperidae (Manual de Acidentes Ofídicos do Ministério da Saúde, 2001).

No Brasil, de acordo com as características das espécies de serpentes existentes no país, são identificados quatro tipos de acidentes ofídicos: os três acidentes – botrópicos, crotálicos e laquéuticos – são causados por serpentes da Família Viperidae e acidentes elapídicos, por serpentes da Família Elapidae (BRASIL, 2017). Entretanto, sabe-se que alguns gêneros das famílias Colubridae e Dipsadidae (anteriormente, consideradas como famílias de serpentes não peçonhentas) possuem peçonha ativa, embora os acidentes com essas espécies sejam muito raros, ou pouco relatados (MESQUITA et al., 2013).

Os gêneros com registros de acidentes pertencentes à família Colubridae são: *Oxybelis* sp. (cobraverde ou cipó) (SILVA et al., 2019b) e *Chironius* sp. (cobra cipó) (WALDEZ; VOGT, 2009). Já, a família Dipsadidae apresenta um maior número de gêneros com registros de acidentes em humanos, no Brasil, como: a cobra verde, conhecida cientificamente por *Philodryas patagoniensis* (ARAUJO; SANTOS, 1997; MEDEIROS et al., 2010) e *Philodryas olfersii* (ARAUJO; SANTOS, 1997; RIBEIRO et al., 1999) a mussurana, *Clelia clelia*, aquela que se alimenta de outras serpentes (PINTO et al., 1991), as falsas-corais dos gêneros *Erythrolampus aesculapii* (MENEGUCCI



et al., 2019), *Oxyrhopus* sp. (SILVEIRA; NISHIOKA, 1992), a cobra-preta (*Boiruna* sp.) (COSTA et al., 2000), *Phalotris* sp., a cobra-d'água (*Helicops* sp.), a serpente-olho-de-gatoanelada (*Leptodeira* sp.) (NASCIMENTO, 2000; WALDEZ; VOGT, 2009; CÂMARA et al., 2020).

Os gêneros *Bothrops* sp. e *Bothrocophias* sp., conhecidos popularmente por jararacuçu, jararaca, urutu, caíçaca, jararaca-do-rabobranco e surucucurana, trata-se de um grupo de serpentes que incluem cerca de 30 espécies em todo território nacional, encontradas em ambientes diversificados como beiras de rios e igarapés, áreas litorâneas e úmidas, agrícolas e periurbanas, cerrados e áreas abertas, e pertencem ao grupo das solenóglifas (BRASIL, 2017; Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2018).

Segundo os dados do Ministério da Saúde (MS) entre os anos de 2000 e 2017, foram notificados 471.801 casos de envenenamento ofídico (BRASIL, 2018). A ocorrência desses acidentes está geralmente relacionada a fatores climáticos e ao aumento da atividade humana nos trabalhos de campo e a atividades de extrativismo (KOH et al., 2006; DOS-SANTOS, 2009). Dos acidentes notificados, o gênero *Bothrops* sp. aparece como o gênero responsável por aproximadamente 90% dos casos, *Crotalus* sp. por 7% e *Lachesus* sp., *Micrurus* sp. e *Leptomicrurus* sp. são responsáveis por 3% dos casos ocorridos no Brasil (BRASIL, 2020).

Em relação a taxa de letalidade, entre os anos de 2000 a 2017, foram notificados 1.892 óbitos por acidentes ofídicos em todo território brasileiro (BRASIL, 2018). Os acidentes com serpentes do grupo crotálico causaram letalidade de 1,87 %, seguido do laquétrico com 0,95%, elapídico (corais-

verdadeiras) com 0,52%, e botrópicos com 0,31% (OLIVEIRA et al., 2009). De modo geral, 53% dessas vítimas receberam o tratamento padrão, o soro antiofídico, em até três horas após o acidente, exceto a região Norte, que a porcentagem caiu para 42% (BOCHNER et al., 2014).

A região Norte do Brasil apresenta o maior número de casos de acidentes ofídicos do país, num total de 142.230 casos notificados no período de 2000 a 2017. O Pará é o Estado da região Norte que apresenta maior notificação desse agravo, com 79.709 casos, seguido do Estado do Amazonas, no qual foram registrados 24.108 casos, no mesmo período (BRASIL, 2018). A maioria dos acidentes ofídicos notificados na Amazônia é atribuída à serpente *Bothrops atrox* (WALDEZ; VOGT, 2009), apesar de existirem doze espécies de serpentes do gênero *Bothrops* sp. nesta região (Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2018).

Bothrops atrox é conhecida popularmente como "surucucurana, jararaca-do-rabo-branco ou jararaca do Norte" e está distribuída desde o Norte da América do Sul ao leste dos Andes (CAMPBELL; LAMAR 2004). Possui uma cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, denticção solenóglifa, presença de fosseta loreal entre o olho e a narina, suas cores podem variar dependendo da localidade em que vivem e pode chegar a medir 1,5 de comprimento (CAMPBELL; LAMAR 2004; MELGAREJO, 2009). É uma serpente ágil e ativa, geralmente encontradas nas beiras dos rios, córregos e igarapés (CARDOSO, 2009) (Figura 2).



Figura 2 – Serpente *Bothrops atrox*. Foto: Samuel Garcia

O envenenamento por *Bothrops atrox* produz acentuados danos teciduais locais, que podem evoluir com repercussão sistêmica, podendo desencadear ainda um quadro importante de alterações hemostáticas (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009). Apesar do baixo índice de letalidade dos acidentes botrópicos, há um grande índice de sequelas, consequentes às atividades do veneno (PINHO; PEREIRA, 2001). Dessa forma, essa revisão teve por objetivo caracterizar a imunofisiopatologia dos acidentes ofídicos atribuídos à espécie *Bothrops atrox* e descrever os tratamentos com o antiveneno padrão e alternativos (plantas medicinais) empregados em casos de envenenamentos por serpentes, na Região Amazônica.

2. Metodologia

A pesquisa bibliográfica que subsidiou a presente revisão foi extraída dos seguintes sites de busca: *Pubmed*, *Periódicos Capes* e *Google scholar*, dentre outros sítios da internet de fontes oficiais, no período de dezembro de 2017 a abril de 2020. Os artigos publicados de janeiro de 1985 a abril de 2020, que apresentavam uma ou mais das palavras-chave listadas a seguir, foram considerados: "*Bothrops sp.*", "*Bothrops atrox*", "snake venom", "snakebite", "immune response", "immunological molecules", anti-snake

venom", "antiophidic plants", "anti-snakebite plants" ou suas respectivas versões em português, quando aplicadas. As palavras foram usadas nas pesquisas bibliográficas ou associadas ou isoladamente. Para seleção de trabalhos foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: 1) Idiomas: inglês, português e espanhol 2) Tópicos escolhidos: envenenamento botrópico, resposta imune ao envenenamento, tratamento para envenenamento por serpentes, plantas antiofídicas. Os critérios de exclusão foram: 1) comunicações em congresso e referências de trabalho; 2) outros idiomas; 3) demais termos ou tópicos apresentados nas buscas nas bases de dados.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Fisiopatologia do envenenamento Botrópico

De uma forma geral, são descritas três atividades fisiopatológicas para o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops sp.*: "proteolítica", mais definida como inflamatória aguda, hemorrágica e coagulante (WARRELL, 2004). Essas atividades são produzidas pela presença de uma complexa mistura de enzimas, no veneno, dentre as quais se destacam as metaloproteínases (SVMP), serinoproteases (SVSP) e as fosfolipases A₂ (PLA₂) (GUTIÉRREZ, 2002; SOUSA et al., 2013).

As PLA₂ representam a maior parte dos componentes tóxicos do veneno das serpentes botrópicas e são responsáveis por uma variedade de efeitos farmacológicos como neurotoxicidade, miotoxicidade, hemólise, anticoagulação, ações sobre as plaquetas, indução de edemas e danos teciduais, produzidos por mecanismos que podem ser dependentes ou independentes de sua atividade enzimática (GUTIÉRREZ; LOMONTE,



2013; SOARES; GIGLIO, 2003). Nesse sentido, estudos mostraram que a hidrólise enzimática de fosfolípido desempenha papel crucial no dano de membranas de células alvo, nas quais a enzima se liga (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013). No entanto, outros estudos relatam que PLA₂ miotóxicas, cataliticamente inativas, desencadeiam respostas inflamatórias e nociceptivas, por mecanismos não relacionados à hidrólise fosfolipídica e mobilização de ácido araquidônico (TEIXEIRA et al., 2003).

As SVSP atuam catalisando ou na conversão direta do fibrinogênio plasmático em fibrina (*thrombin-like* ou trombina-símiles), sem a participação de trombina endógena. Em função de suas atividades catalíticas, as SVSP agem, também, em outros componentes do Sistema de Coagulação, produzindo alterações na hemostasia, o que pode contribuir para uma hemorragia local ou sistêmica, como na ativação do fator V, ou na fibrinogênólise, ou ativando o plasminogênio ou induzindo a agregação plaquetária (SERRANO; MAROUN, 2005).

As SVMP, por sua vez, são toxinas que induzem efeitos em componentes da matriz extracelular da membrana basal (laminina, fibronectina e colágeno tipo IV, proteína principal do proteoglicano de sulfato de heparano) de capilares sanguíneos, fibras musculares esqueléticas e junções dermo-epidérmicas (GUTIÉRREZ et al., 2016). As SVMP agem lesando a parede dos vasos e desencadeando hemorragia por dois possíveis mecanismos: diretamente sobre proteínas que compõem a parede vascular, promovendo a hidrólise dessas proteínas, afetando a estabilidade do endotélio, e resultando em sangramento (BALDO et al., 2010) e indiretamente, por meio da ativação de

metaloproteinases endógenas (BJARNASON; FOX, 1995).

Os danos causados por essas toxinas SVMP à membrana basal dermo-epidérmica podem ocasionar formação de bolhas próximo ao local da picada e dermonecrose (GUTIÉRREZ et al., 2016). Além de provocarem a formação de bolhas e hemorragia local e sistêmica as SVMP são alôgenas e fortemente pró-inflamatórias (FOX; SERRANO, 2005; TEIXEIRA et al., 2005; GUTIÉRREZ et al., 2000). As SVMP são as principais constituintes do veneno de *Bothrops atrox*, sendo a classe P-III a toxina predominante (SOUSA et al. 2013; 2017).

As ações produzidas pelas toxinas presentes nos venenos de *Bothrops atrox* podem produzir efeitos locais e sistêmicos (BORGES et al., 1999). Os efeitos locais produzidos pelo veneno botrópico incluem sintomas como dor, edema, hemorragia e necrose (BARROS et al., 1998; PETRETSKI et al., 2000; OTERO et al., 2000), esta última podendo levar a perda permanente do tecido e de sua funcionalidade, e de forma mais grave, desencadear a amputação do membro atingido. Uma complicação grave em acidentes botrópicos é a síndrome compartimental, que ocorre devido à compressão de feixe vasculo-nervoso, consequente ao edema volumoso desencadeado no membro acometido, podendo levar a danos teciduais importantes com repercussões sistêmicas. Há, ainda, relatos de sepse devido a infecção secundária, presente no local da picada por *Bothrops* sp. com cultura positiva para *Morganella morganii* resistente às penicilinas e cefalosporinas (LUCIANO et al., 2009). Estes efeitos locais são desencadeados muito rapidamente, dificultando a neutralização, principalmente quando o antiveneno não é administrado logo



após o acidente (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009; BRASIL, 2010).

Os efeitos sistêmicos, por sua vez, são desencadeados por importantes alterações hemostáticas, levando as vítimas mais graves a apresentarem aumento no tempo de coagulação e hemorragias em locais distantes da picada, causando gengivorragia, hematêmese e hematúria. Podem ser observados ainda incoagulabilidade sanguínea devido ao consumo de fibrinogênio endógeno por toxinas do veneno, e menos comum, insuficiência renal aguda e choque, esses achados podem estar relacionados à quantidade de veneno inoculado (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; KAMIGUTI et al., 1996; GUTIÉRREZ et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2016).

3.2 Envenenamento por *Bothrops atrox* e resposta imune

O envenenamento por *Bothrops atrox* causa alterações fisiopatológicas com processos inflamatórios locais intensos, entretanto os mecanismos envolvidos no processo inflamatório em humanos ainda não estão completamente elucidados. Vários mediadores inflamatórios são liberados por células, no local da picada, ou pela injeção de veneno *Bothrops atrox*, ou pela variedade de toxinas presentes em sua composição (CALVETE et al., 2011).

Dessa forma, alguns trabalhos propõe que a resposta inflamatória pode estar relacionada a existência de moléculas do veneno que, quando injetadas no hospedeiro, são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) e desencadeiam a inflamação, as quais foram denominadas por padrões moleculares associados ao veneno (VAMP), ou de se ligarem aos DAMP (padrões moleculares associados aos

danos) liberados após a lesão tecidual (MOREIRA et al., 2013; ZOCCAL et al., 2014; MOREIRA et al., 2016).

Embora os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp. possuam composições bastante complexas, as toxinas SVMP e PLA₂ desempenham importante papel no processo inflamatório descrito para envenenamentos por essas serpentes (MENALDO et al., 2017). Estudos realizados para avaliar essas duas toxinas demonstraram que as SVMP induzem reações inflamatórias significativas, promovendo a infiltração de leucócitos e a liberação de mediadores por células imunes estimuladas, como macrófagos e mastócitos (COSTA et al., 2002; RUCAVADO et al., 2002), já os efeitos desencadeados por PLA₂ estão relacionados principalmente ao aumento da permeabilidade vascular, que desencadeia o edema, e à degranulação dos mastócitos, que libera histamina e outros mediadores (TEIXEIRA et al., 2003).

Outro estudo demonstrou o papel da galatrox, uma lectina do tipo C, presente no veneno de *Bothrops atrox*, em induzir inflamação aguda, por meio de sua ligação com glicanos. Os resultados encontrados pelos autores sugerem que galatrox é capaz de mediar a atividade pró-inflamatória, interagindo com glicanos contendo LacNac em neutrófilos, macrófagos e proteínas da matriz extracelular e induzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios (SARTIM et al., 2014).

Da mesma forma, componentes específicos do veneno, tais como a metaloproteinase, a batroxase, pode desempenhar papel importante na evolução dos sinais e sintomas inflamatórios, após envenenamento, uma vez que essa enzima é capaz de clivar componentes do Sistema



Complemento, levar a síntese aumentada de anafilatoxinas (C5a, C3a e C4 a) e induzir a degranulação de mastócitos e o recrutamento de neutrófilos (MENALDO et al., 2016).

Algumas pesquisas já mostraram que os efeitos inflamatórios induzidos pelos venenos botrópicos incluem a liberação de eicosanoides, como prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos (FARSKY et al., 1997; ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002; MOREIRA et al., 2007; MOREIRA et al., 2012). Estes compostos estão envolvidos na promoção de eventos inflamatórios locais, como dor, edema, quimiotaxia e ativação de leucócitos (OLIVO et al., 2007; ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002; TEIXEIRA et al., 2009).

Em trabalho realizado por Moreira e colaboradores (2012) para avaliar a reação inflamatória provocada pelo veneno de *Bothrops atrox* na cavidade peritoneal de camundongos, com foco nos eventos agudos, os autores observaram que o veneno induz uma resposta inflamatória aguda no local da injeção, pelo aumento da permeabilidade vascular e do influxo leucocitário. Neutrófilos e monócitos (macrófagos) foram as principais células infiltradas, logo após a injeção do veneno. Os autores observaram, ainda, a produção de eicosanoides prostaglandinas (PGD₂, PGE₂), tromboxanos (TXA₂), leucotrienos (LTB₄) e das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12 e da quimiocina CCL-2, e relataram a ausência da INF- γ . Outro achado relatado foi a regulação da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) pelo veneno em células inflamatórias, o que pode ser um mecanismo importante na produção de PG e TXA₂ pelo veneno (MOREIRA et al., 2012).

Embora vários estudos tenham demonstrado que mediadores inflamatórios são produzidos em

resposta ao veneno de *Bothrops atrox*, existem poucas informações sobre as vias moleculares envolvidas na sinalização do sistema imune inato. Um dos artigos pioneiros foi o de Moreira e colaboradores (2013) sobre o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) que é uma molécula adaptadora responsável pela transmissão de sinais intracelulares da maioria dos receptores "Toll-like" (TLRs), com exceção do TLR-3, depois que esses interagem com os seus respectivos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) ou outros estímulos, como com padrões moleculares associados aos danos (DAMP), ou, provavelmente, aos padrões moleculares associados aos venenos (VAMP). A via dependente de MyD88 leva à ativação de fatores de transcrições, que por sua vez induzem a síntese de mediadores inflamatórios, como eicosanoides, citocinas e quimiocinas (MOREIRA et al., 2013).

Para demonstrar a participação do MyD88 na resposta inflamatória aguda induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, camundongos do tipo selvagem C57BL/6 e camundongos nocauteados para impedir a expressão do MyD88 foram injetados intraperitonealmente com o veneno. Os animais nocauteados apresentaram resposta inflamatória prejudicada ao veneno, com menor migração de células polimorfonucleares e mononucleares para a cavidade peritoneal. Além disso, leucócitos peritoneais não induziram a expressão da proteína COX-2 ou LTB₄ e liberaram baixas concentrações de PGE₂. Esses camundongos também falharam em produzir citocinas dos perfis Th1 e Th17 e CCL-2, mas os níveis de IL-10 foram semelhantes nos dois grupos de camundongos (MOREIRA et al., 2013). Os TLR dependentes de MyD88 também são importantes no desencadeamento das funções regulatória da inflamação e



de reparo tecidual (ERRIDGE, 2010, YU et al., 2010).

Em trabalho realizado por Moreira e colaboradores (2016) para avaliar o papel desempenhado pelo TLR2 na resposta inflamatória aguda induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, foi demonstrado por protocolos, *in vivo*, que o TLR2 exerce função importante na modulação de alguns componentes envolvidos no processo inflamatório local induzido pelo veneno, conferindo efeitos protetores em respostas excessivas mediadas por moléculas como a citocina IL-6. Os autores observaram ainda que o TLR2 ativa vias de sinalização que desencadeiam a produção de IL-1 \cdot e LTB $_4$, porém não exercem influência na produção de PGE $_2$ e TXA $_2$, via COX-2 e COX-1, respectivamente (MOREIRA et al., 2016). O TLR-2 pode ser ativado pela presença de DAMP (PICCININI; MIDWOOD, 2010).

Em trabalho realizado por Almeida e colaboradores para avaliar os efeitos inflamatórios induzidos por duas metaloproteinases, com o objetivo de compreender melhor os mecanismos envolvidos na reação inflamatória, os autores observaram que Atoxlysin-Ia (ATXL) e Batroxrhagin (BATXH), isoladas no veneno de *Bothrops atrox* podem induzir resposta inflamatória por ação direta em células inflamatórias ou pela liberação de peptídeos pró-inflamatórios de proteínas da membrana basal que podem amplificar a ação direta de SVMP, por meio da ativação de vias de sinalização endógenas (ALMEIDA et al., 2020). Fragmentos de matriz extracelular produzidos ação proteolítica das metaloproteinases podem ser reconhecidos por PRR e atuarem como DAMP, desencadeando uma série de eventos pró-inflamatórios da resposta imune inata, que podem influenciar a resposta imune adaptativa (FREVEST et

al., 2018). A liberação dos DAMP, nos processos inflamatórios, pode modular a síntese de mediadores próinflamatórios, ativação, diferenciação e proliferação celular e estimular processos de regeneração (SOROKIN, 2010; ANDERS; SCHAEFER, 2014).

A resposta observada em humanos apresenta um efeito semelhante aos modelos experimentais, com aumento de IL-6, IL-10, CXCL-8 (anteriormente denominada como IL-8) e CCL-3/CCL4), um processo relacionado à indução da resposta imune, febre, migração celular e regulação do perfil da resposta (AVILA-AGUERO et al., 2001).

Em pesquisa realizada com pacientes de envenenamento por *Bothrops atrox*, para descrever as quimiocinas, anafilatoxinas e citocinas presentes no processo inflamatório causado pelo veneno, os autores observaram que todos os acidentados apresentaram altos níveis de citocinas e quimiocinas, e o perfil de resposta circulante diferiu entre os pacientes que apresentaram quadro de envenenamento leve em relação aos classificados como moderados ou grave. Indivíduos acidentados que apresentaram leve complicação local, com quadro envenenamento leve, apresentaram um perfil misto de resposta, com alta produção de moléculas IL-6 e IL-10, enquanto aqueles que apresentaram complicação local grave, com envenenamento moderado ou grave e manifestações locais como púrpura, equimose, edema grave, formação de bolhas e necrose no local da picada, um perfil mais polarizado para resposta Th1, maiores concentrações circulantes de quimiocinas CXCL-8, CCL-5, CXCL-10 e CCL-2 e citocinas IL-6, IL-10 e IL-2, e com uma resposta imune local da picada mais intensa e polarização Th1/Th2/Th17, observando-se uma



resposta local diferente da circulante (IBIAPINA et al., 2019).

3.3 Tratamento para acidentes ofídicos

No Brasil, o tratamento preconizado, pelo Ministério da Saúde, para acidentes ofídicos é a administração endovenosa do antiveneno, em doses que variam de acordo com a gravidade do envenenamento. No país, quatro instituições de pesquisas produzem esses imunobiológicos, que são: o Instituto Butantan, em São Paulo (SP), a Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte (MG), Instituto Vital Brazil, em Niterói (RJ) e o Centro de Produção de Pesquisa, em Imunobiológicos em Curitiba (PR).

A forma de produção do soro antiofídico ainda é baseada nos métodos originalmente descritos, em que equinos são imunizados com misturas de venenos de uma ou mais espécies de serpentes de importância médica, que após o término do esquema de imunização, os sangues desses animais hiperimunes são colhidos e as imunoglobulinas totais isoladas do plasma (CARDOSO, 2009), ainda por métodos, como o de Pope, 1938, que não separam eficazmente as imunoglobulinas, deixando alguns contaminantes séricos (DOS-SANTOS et al., 1989).

Apesar da eficácia da soroterapia contra os efeitos sistêmicos induzidos pelo veneno, esses imunobiológicos apresentam algumas desvantagens, dentre estas, possíveis efeitos colaterais, incluindo reação anafilática ou Hipersensibilidade do tipo I, caso o paciente já tenha sido tratado com imunoglobulinas equinas ou a Hipersensibilidade do tipo III, que é a doença do soro causada pela presença de proteínas heterólogas que induzem a produção de anticorpos, em pacientes

tratados com imunobiológicos heterólogos (CARDOSO et al., 2009).

Outras espécies de animais como ovelhas e camelídeos (camelos, lhamas e alpacas) já foram, alternativamente, empregadas no processo de imunização para obtenção de anticorpos antitoxinas, a fim de reduzir as reações adversas que podem ocorrer em pacientes, devido à exposição ao soro de cavalo (WEN, 2009; RICHARD et al. 2013). Ovelhas não apresentam anticorpos da classe G, altamente alergênicos, e alguns antivenenos foram produzidos comercialmente e testados mostrando semelhança ao soro de cavalos, porém a biodisponibilidade do soro ovino apresentou-se menor que a obtida com soro equino, o que leva a necessidade de doses adicionais, e reações ao soro ovino também já foram descritas (DART et al., 2001; HOLSTEGE et al., 2002). Por outro lado, os camelídeos, devido as características únicas do seu sistema imune, menor imunogenicidade e ausência de cadeias leves em 50% de suas imunoglobulinas, têm recebido crescente interesse, nos últimos anos, em pesquisas para produção de antivenenos, porém não há, ainda, antiveneno comercial disponível (HAMERSCASTERMAN et al., 1993; HERRERA et al., 2005; RICHARD et al. 2013).

No Brasil, os soros produzidos são classificados como monovalente ou bivalente e esta classificação é baseada no número de gêneros de serpentes, as quais os venenos foram empregados na imunização de equinos, para obtenção do imunobiológico (CARDOSO, 2009). Estes soros monovalentes ou bivalentes são capazes de neutralizar as toxinas de venenos dos principais gêneros de serpentes causadoras de envenenamento no país e, assim, estão disponíveis: antielapídico elaborado com os venenos duas espécies do gênero



Micrurus sp. (*M. frontalis* e *M. coralinus*); antilaquétrico, com o de *Lachesis muta*; anticrotálico, com os venenos das subespécies *Crotalus durissus terrificus* e *C. d. colilineatus*; antibotrópico para os venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*; antibotrópico-laquétrico, com ação sobre envenenamento por *Bothrops* sp. e *Lachesis* sp.; e antibotrópico-crotálico, contra os venenos das serpentes dos gêneros *Bothrops* sp. e *Crotalus* sp. (CARDOSO et al., 2009).

Apesar de a maioria dos acidentes botrópicos na região Amazônica serem atribuídos à espécie *Bothrops atrox*, os antibotrópicos produzidos, no Brasil, utilizados no acidentes por *Bothrops* sp. e *Bothrocophias* sp. (BRASIL, 2017), são elaborados pela imunização de equinos com misturas de venenos que incluem somente cinco espécies de *Bothrops* sp., das 30 existentes no país: *Bothrops jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. alternatus* e *B. neuwiedi* (BRASIL, 1996), espécies que habitam principalmente as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (PINHO; PEREIRA, 2001; CAMPBELL; LAMAR, 2004). Portanto, o veneno de *Bothrops atrox* não foi incluso na mistura usada na imunização devido a dificuldade de se obter uma quantidade padronizada desse veneno (CALVETE et al., 2011).

A falta de antígeno na produção de soro específico também pode ser observada no antielapídico, produzido apenas a partir de *Micrurus frontalis* e *Micrurus corallinus*, sendo utilizado no tratamento das 36 espécies do gênero *Micrurus* sp. e três espécies do gênero *Leptomicrurus* sp., existentes no território brasileiro (PINHO; PEREIRA, 2001). Dentre essas, *Micrurus surinamensis* a espécie existente na Amazônia, que possui veneno

evolutivamente adaptado para alimentação em ambiente aquático, para imobilizar rapidamente a presa (SANZ et al., 2019), pode apresentar toxinas diferentes das outras espécies do seu gênero e, portanto, não serem neutralizadas pelos antielapídicos existentes.

Alguns estudos sugeriram que os antivenenos botrópicos produzidos no país não neutralizam eficazmente os danos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox* (MUNIZ et al., 2000; FURTADO et al., 2010), mas outros demonstram que o soro antibotrópico pode neutralizar as toxinas deste veneno (CAMEY et al., 2002; SEGURA et al., 2010; SOUSA et al., 2013). Todos esses estudos foram realizados utilizando-se incubação prévia do veneno com o antiveneno, o que não representa a situação real, uma vez que o tratamento com antiveneno dá-se após o início dos efeitos induzido pelo veneno (PARDAL et al., 2004) ou por ensaio imunoenzimáticos, que demonstram títulos de anticorpos, mas não eficácia de neutralização.

Uma alternativa terapêutica para os efeitos locais desencadeados pelos acidentes botrópicos seria a utilização de imunoglobulinas íntegras (Ig totais com região Fc), associadas aos fragmentos de imunoglobulinas, Fab ou F(ab')₂, obtidos pela clivagem enzimática induzida pela pepsina ou papaína, respectivamente. A forma íntegra de imunoglobulinas permanece mais tempo no organismo, mas se difunde menos que a Fab para atingir um fluido intersticial. Dessa forma, a associação destas imunoglobulinas poderia proporcionar um soro com maior tempo de permanência no organismo, para neutralizar as toxinas com ações sistêmicas, e com melhor distribuição, neutralizando as toxinas presentes no interstício (GUTIÉRREZ, et



al., 2011). No Brasil, a Farmacopeia Brasileira (1938) recomenda a produção dos soros com o fragmento $F(ab')_2$, pois a presença da região F_c , das imunoglobulinas equinas, ativaría os componentes do Sistema Complemento, o que não foi observado (MORAIS et al., 1994).

Segundo Laustsen e colaboradores (2018) pode-se esperar uma maior avidéz (afinidade funcional entre múltiplos anticorpos com o veneno) de um antiveneno baseado em IgG ou $F(ab')_2$ do que o elaborado com Fab, tendo em vista a natureza bivalente dos dois primeiros formatos, aumenta a possibilidade de ligação da toxina com o anticorpo (LAUSTSEN et al., 2018). Adicionalmente, ligações cruzadas com outros complexos de toxina-anticorpo podem ocorrer fazendo com que seja menos possível o escape de toxinas, durante a dissociação transitória do complexo (RUDNICK; ADAMS, 2009).

A oferta dos soros antiofídicos para a população brasileira apresenta algumas deficiências. As dificuldades enfrentadas incluem a necessidade de cuidados de estocagem correta do soro líquido (não liofilizado) e com prazo de validade (CARDOSO et al., 2009); indisponibilidade do soro em algumas regiões do país, onde não existe atenção médica estruturada; e dificuldades de distribuição do soro para algumas localidades com longas distâncias geográficas e acesso precário (DOS-SANTOS, 2009).

Dessa forma, nessas localidades onde os antivenenos estão indisponíveis ou em pouca quantidade, os acidentados, como os da Amazônia, buscam tratamento alternativos, por exemplo, o uso de plantas medicinais, tradicionalmente utilizadas como antiofídicas, para que possam atuar como complementação à soroterapia, ou

ainda como o único recurso terapêutico (DOSSANTOS, 2009).

3.4 Plantas medicinais e fitoterápicos utilizados no tratamento de envenenamento por serpentes

O uso de plantas medicinais para o tratamento de envenenamento por serpentes é relatado há muito tempo, especialmente em locais onde é difícil obter antiveneno específico. Em alguns países, onde o Acidente Ofídico é um problema de saúde pública, as populações se vêm obrigadas a procurar alternativas terapêuticas para esse tipo de agravo, geralmente buscando o campo da fitoterapia ou do conhecimento tradicional (CARDOSO, 2009). Em todo o mundo, um grande número de extratos e seus compostos isolados têm sido testado, demonstrando, pelo menos em testes, *in vitro*, capacidade de bloqueio frente as atividades biológicas induzidas pelo veneno de serpentes (SAM Y et al., 2012; FÉLIX-SILVA et al., 2017).

No Brasil, o extrato aquoso de *Jatropha gossypifolia*, uma planta utilizada na medicina popular para tratar mordidas de serpentes, foi capaz de inibir efeitos locais hemorrágicos, edematogênicos e miotoxicidade induzidos pelo veneno de espécies de *Bothrops* sp., utilizando protocolos que simulam o uso popular da planta (FÉLIX-SILVA et al., 2014; FÉLIX-SILVA et al., 2017; FÉLIX-SILVA et al., 2018). Metabólitos secundários isolados do extrato vegetal da casca da raiz de *Bombacopsis glabra* bloquearam a atividade fibrinogenolítica induzida pelo veneno de *Bothrops pauloensis* e sua toxina metaloproteinase isolada, inibindo também eficientemente a hemorragia e atividade miotóxica induzidas pela toxina metaloproteinase de *B. jararaca* (MENDES et al., 2013). O



extrato etanólico de *Morus nigra* L. e seus compostos encapsulados exerceram efeitos anti-inflamatórios no edema local induzido por *Bothrops jararacuçu*, em camundongos (RIBEIRO et al., 2019).

Na Amazônia, espécies vegetais da região também têm se mostrado eficazes em inibir as atividades do veneno de *Bothrops atrox*, como a espécie *Marsiphyanthus chamaedris* (Lamiaceae), cujos extratos de folhas e contusos inibiram a atividade edematogênica, coagulante do veneno e inibiram a liberação de citocinas pró-inflamatórias (MAGALHÃES et al., 2011). Na região de Parintins (AM) os contusos de paracari, nome popular dado tanto para as espécies vegetais *Peltodon radicans* e *Marsiphiantes chamaedrys*, são usados para o tratamento do acidente ofídico e ambas espécies foram testadas pelos métodos tradicionais e foram eficazes em bloquear a ação edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* (BORGES et al., 1996 e MAGALHÃES et al., 2011).

Em levantamento etnobotânico realizado por Moura et al., (2015) em comunidades de Santarém, PA, foram citadas 24 espécies de plantas de uso antiofídico, sendo que 12 das espécies indicadas foram testadas experimentalmente contra veneno de *Bothrops jararaca*, e apresentaram resultados expressivos para atividade antiedematogênica e anti-hemorrágica induzidas pelo veneno, entre essas, a espécie vegetal *Bellucia dichotoma* apresentou atividade antiedematogênica significativa.

O extrato aquoso produzido a partir de cascas de *Bellucia dichotoma*, em forma de chá por decocção, quando testado quanto ao seu potencial de bloqueio contra atividade hemorrágica induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* apresentou 100% de inibição

no protocolo de pré- incubação (veneno: extrato) (MOURA et al., 2015), porém estes resultados não foram obtidos com ensaios que simulam o uso tradicional. Em outro trabalho, quando testado por via oral, de acordo com uso tradicional, o edema induzido pelo veneno de *B. atrox* foi significativamente ($p < 0,05$) reduzido pelos pré e pós-tratamentos (v.o), nas doses testadas, e a redução foi ainda mais efetiva, quando o extrato foi administrado como coadjuvante ao soro antibotrópico (MOURA et al., 2014). Além disso, não foram observadas variações geográficas nos constituintes dos extratos aquosos de *B. dichotoma* provenientes de coletas em dois Estados, Amazonas e Pará, pois demonstraram potencial inibitório semelhante contra atividades biológicas do veneno de *Bothrops atrox*, fornecendo subsídios importantes para o controle de qualidade da matéria-prima e a padronização de fitoterápicos (MOURA et al., 2017).

Os achados positivos quanto ao bloqueio do veneno de serpentes por espécies vegetais foram atribuídos a atividade biológica de alguns metabólitos secundários presentes na sua constituição química, tais como: flavonóides, alcalóides, taninos, cumarinas, triterpenos, dentre outros, que têm a capacidade de inibir o veneno de serpentes, atuando diretamente como inibidores enzimáticos ou inativadores químicos, os quais interagem diretamente com macromoléculas alvo (MORS et al., 2000), ou quelando íons importantes para as atividades enzimáticas ou estruturais de moléculas (MOURA et al., 2014).

Apesar de existirem vários trabalhos que evidenciam o potencial antiofídico de plantas medicinais, não existe, até o momento, um produto padronizado para



esta finalidade. Porém, vale ressaltar, que a maioria desses estudos foi realizada por protocolos de pré-incubação o que pode superestimar os resultados (MOURA et al., 2014; SHABBIR, et al., 2014) e dessa forma, várias espécies vegetais devem ser reavaliadas quanto as suas atividades antifúngicas.

Atualmente, no Brasil, muito dos fitoterápicos indicados como bloqueadores das atividades dos venenos, disponíveis no comércio, são utilizados sem embasamento científico. O Específico Pessoa, o produto mais comercializado nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, foi o único estudado e não apresentou ação terapêutica, *in vivo*, frente ao veneno de *Bothrops atrox* (BORGES et al., 1996). Já, para o produto Pau-X, largamente utilizado na região Oeste do Pará, não foram encontrados trabalhos científicos, que evidencie sua eficácia (MOURA; MOURÃO, 2012). Além da utilização de fitoterápicos, como o Pau-X, a população da região Oeste do Pará usa com bastante frequência plantas medicinais isoladas em formas de chás, cataplasmas, tinturas ou em conjunto similar ao produto Balsâmo da Amazônia (MOURA et al., 2015), produzido a partir de três espécies vegetais (*Philodendron megalophyllum*, *Libidibea ferrea*, *Conarus favosus*) e comercializado no Eixo Forte da região de Santarém, Pará.

Segundo Moura e colaboradores (2014), de modo geral, com raras exceções, a fitoterapia antiveneno no meio científico está baseada em dados que superestimam a capacidade antifúngica dos extratos vegetais, devido a metodologia aplicada nos testes, por exemplo, a pré-incubação. Portanto, há necessidade de uma avaliação criteriosa da eficácia desses extratos e compostos vegetais por protocolos, que simulem o uso tradicional, quando o objetivo é a

produção de um fitoterápico coadjuvante à soroterapia convencional.

4. Considerações finais

Os acidentes por *Bothrops atrox* são caracterizados por distúrbios hemostáticos e inflamação local acentuada. As toxinas SMVP e PLA2 são fortemente pró-inflamatórias, produzindo seus efeitos pela indução da liberação de eicosanoides, ativação do Sistema Complemento, síntese de citocinas e quimiocinas e também pela ativação leucocitária. A compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no envenenamento é importante para a elucidação da sintomatologia observada nos pacientes, assim como auxiliar na busca de tratamentos que possam reverter os efeitos locais, observados nas vítimas de acidentes por *Bothrops atrox*, que não são neutralizados eficazmente pelos antivenenos disponíveis.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão de bolsa de Produtividade número 307237/2019-2, a MCS. Agradecimento aos membros da Banca de qualificação Professor Doutor Marco Aurélio Sartim, Professora Doutora Salvana Priscylla Manso Costa e Ariandra Guerini Sartim.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências



ALMEIDA, M. T.; FREITAS-DE-SOUSA, L. A.; COLOMBINI, M.; GIMENES, S. N. C.; KITANO, E.; FAQUIM-MAURO, E.; SERRANO, S. M. T.; MOURA-DA-SILVA, A. **Inflammatory Reaction Induced by Two Metalloproteinases Isolated from Bothrops atrox Venom and by Fragments Generated from the Hydrolysis of Basement Membrane Components.** *Toxins*, v. 12, n. 2, 2020.

ANDERS, H.; SCHAEFER, L. **Beyond Tissue Injury – Damage-Associated Molecular Patterns, Toll-Like Receptors, and Inflammasomes Also Drive Regeneration and Fibrosis.** *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 25, n. 7, p. 1387–1400, 2014.

ARAÚJO, M. E.; SANTOS, A. C. M. C. A. **Cases of human envenoming caused by Philodryas olfersii and Philodryas patagoniensis (serpentes: Colubridae).** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 6, p. 517–519, 1997.

ÁVILA-AGÜERO, M. L.; PARIS, M. M.; PETERSON P. K.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; FAINGEZICHT, I. **Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica.** *Pediatric Emergency Care*, v. 17, n. 6, p. 425–429, 2001.

BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. **Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 6, p. 727–742, 2010.

BARROS, S. F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V. L.; KIPNIS, T. L.

Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with Bothrops atrox venom. *Mediators of Inflammation*, v. 7, n. 5, p. 339–346, 1998.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. **Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins.** In: *Methods in Enzymology*. Elsevier. 1995. v. 248p. 345–368.

BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; MACHADO, C. **Profile of Snake Bites in Brazil, 2001 to 2012.** *Journal of Clinical Toxicology*, v. 4, n. 3, 2014.

BORGES, C. C.; CAVALCANTI-NETO, A. J.; BOECHAT, A. L.; FRANCISCO, C. H.; ARRUDA, M. R.; SANTOS, M. C. **Eficácia da espécie vegetal Peltodon radicans (Labiatae, Lameaceae) na neutralização da atividade edematogênica e ineficácia do extrato vegetal Específico Pessoa na neutralização das principais atividades do veneno de Bothrops atrox.** *Revista da Universidade do Amazonas*. v.1, p. 97–113, 1996.

BORGES, C. C.; SADAHIRO, M.; SANTOS, M. C. **Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 6, p. 637–646, 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996. Aprova as Normas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Anti-Rábico.** *Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil*. Brasília, 12 nov. 1996.



BRASIL. Ministério da Saúde (2001). **Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília: MS/FUNASA.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL; Ministério da Saúde. **Acidente por Animais Peçonhentos. Sistema de Informação e Agravo de Notificação. Dados epidemiológicos e Estatísticas**. 2020 Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animaispeconhentos>>. Acesso em: 28 jul. 2020.

BRASIL; Ministério da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos – Serpentes**. 2017. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-az/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

BRASIL; Ministério da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos – serpentes. Situação Epidemiológica - Dados**. 2018. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-az/acidentes-por-animais-peconhentos/13712-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H. V.; FURTADO, M. F. D.; MOURA-DA-SILVA,

A. M. **Snake population venomics and antivenomics of Bothrops atrox: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management**. *Journal of Proteomics*, v. 74, n. 4, p. 510–527, abr. 2011.

CÂMARA, O. F.; SILVA, D. D.; HOLANDA, M. N.; BERNARDE, P. S.; SILVA, A. M.; MONTEIRO, W. M.; LIMA, M. V. M.; MONTEIRO, A.; WAJNSZTEIN. **Envenenamentos ofídicos em uma região da Amazônia Ocidental Brasileira**. *Journal of Human Growth and Development*, v. 30, n. 1, p. 120–128, 2020.

CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. **Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil**. *Toxicon*, v. 40, n. 5, p. 501–509, 2002.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London. 1032 pp, 2004.

CARDOSO, J. L. C. A fitoterapia antiveneno na medicina brasileira. in: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad Jr., V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 481-485.

COSTA, E. P.; CLISSA, P. B.; TEIXEIRA, C. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M. **Importance of metalloproteinases and macrophages in Viper snake envenomation-induced local**



inflammation. *Inflammation*, v. 26, n. 1, p. 13–17, 2002.

COSTA, M. C. S.; OUTEIRAL, A. B.; D'AGOSTINI, F. M.; CAPPELLARI, L. H. **Envenomation by the neotropical colubrid *Boiruna maculata* (Boulenger, 1896): a case report.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 42, n. 5, p. 283–286, 2000.

DART, R. C.; SEIFERT, S. A.; BOYER, L. V.; CLARK, R. F.; HALL, E.; MCKINNEY, P.; MCNALLY, J.; KITCHENS, C.S.; CURRY, S. C.; BOGDAN, G. M.; WARD, S. B.; PORTER, R.S. **A Randomized Multicenter Trial of Crotalinae Polyvalent Immune Fab (Ovine) Antivenom for the Treatment for Crotaline Snakebite in the United States.** *Archives of Internal Medicine*, v. 161, n. 16, p. 20-30, 2001.

DOS-SANTOS, M. C. Serpentes peçonhentas e ofidismo no Amazonas. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 11, p.132-142.

DOS-SANTOS, M. C.; DIMPERIOLIMA, M.; FURTADO, G.; COLLETO, G.; KIPNIS, T.; DIAS DA SILVA, W. **Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: A fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield.** *Toxicon*, v. 27, n. 3, p. 297–303, 1989.

ERRIDGE, C. **Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?** *Journal of Leukocyte Biology*, v. 87, n. 6, p. 989–999, 2010.

FARSKY, S. H. P.; WALBER, J.; COSTACRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P. **Leukocyte response induced by Bothrops jararaca crude venom: *In vivo* and *in vitro* studies.** *Toxicon*, v. 35, n. 2, p. 185– 193, 1997.

FELIX-SILVA, J.; GOMES, J. A. S.; FERNADES, J. M.; MOURA, A. K. C.; MENEZES, Y. A. S.; SANTOS, E. C.G.; TAMBOURGI, D. V.; SILVA-JUNIOR, A. A.; ZUCOLOTO, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. **Comparison of two *Jatropha* species (Euphorbiaceae) used popularly to treat snakebites in Northeastern Brazil: Chemical profile, inhibitory activity against *Bothrops erythromelas* venom and antibacterial activity.** *Journal of ethnopharmacology*, v. 213, p. 12-20, 2018.

FÉLIX-SILVA, J.; SILVA-JUNIOR, A.; ZUCOLOTO, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. **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, p. 1–52, 2017.

FÉLIX-SILVA, J.; SOUZA, T.; MENEZES, Y. A. S.; CABRAL, B.; CÂMARA, R. B. G.; SILVAJUNIOR, A. A.; ROCHA, H. A. O.; REBECCHI, I. M. M.; ZUCOLOTO, S. M.; FERNANDESPEDROSA, M. F. **Aqueous Leaf Extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) Inhibits Enzymatic and Biological Actions of *Bothrops jararaca* Snake Venom.** *PLoS One*, v. 9, n. 8, 2014.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. **Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin**



family of metalloproteinases. *Toxicon*, v. 45, n. 8, p. 969–985, 2005.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 6, p. 81-95

FREVEST, C. W.; FELGENHAUER, J.; WYGRECKA, M.; NASTASE, M. V.; SCHAEFER, L. **Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, p 1-15, 2018.

FURTADO, M. F. D.; CARDOSO, S. T.; SOARES, O. E.; PEREIRA, A. P.; FERNANDES, D. S.; TAMBOURGI, D. V. **Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of Bothrops venoms from snakes of the Amazon region.** *Toxicon*, v. 55, n. 4, p. 881–887, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M. **Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones em América Latina.** *Revista De Biología Tropical*, v. 50, n. 2, p. 377–394, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. **Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by Bothrops asper snake venom.** *Toxicon*. v. 54, n. 7, p. 976–987, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; HERRERA, C. **Hemorrhage caused by Snake Venom metalloproteinases: a journey of discovery and**

understanding. *Toxins*, v. 8, n. 4, p. 1–19, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; LÉON, G LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y. **Antivenoms for Snakebite Envenomings.** *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v. 10, n. 5, p. 369–380, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico em América Latina. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 33, p. 352-375.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. **Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins.** *Toxicon*, v. 62, p. 27–39, 2013.

GUTIÉRREZ, J.; LOMONTE, B. **Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms.** *Toxicon*, v. 33, n. 11, p. 1405–1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.; RUCAVADO, A. **Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage.** *Biochimie*, v. 82, n. 9–10, p. 841–850, 2000.

HAMERS-CASTERMAN, C.; ATARHOUCHE, T.; MUYLDERMANS, S.; ROBINSON, G.; HAMERS, C.; SONGA, E. B.; BENDAHDAN, N.; HAMMERS, R. **Naturally occurring antibodies devoid of light chains.** *Nature*, v. 363, n. 6428, p. 446–448, 1993.

HERRERA, M.; LEO'N, G.; SEGURA, A.; MENESES, F.; LOMONTE, B.; CHIPPAUX, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M. **Factors**



associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camel IgGs. *Toxicon*, v. 46, n. 7, p. 775–781, 2005.

HOLSTEGE, C. P.; WU, J.; BAER, A. B. **Immediate hypersensitivity reaction associated with the rapid infusion of Crotalidae polyvalent immune Fab (ovine).** *Annals of Emergency Medicine*, v. 39, n. 6, p. 677–679, 2002.

IBIAPINA, N. H.; GUIMARÃES, A. C.; SACHETT, J. A.; SILVA, I. M.; TARRAGÔ, A. M.; NEVES, J. C.; KERT, M. A.; SANTANA, M. F.; MARTINS-FILHO, O. A.; LACERDA, M. V.; FERREIRA, L. C.; MALHEIRO, A.; MONTEIRO, W. M. **An Immunological Stairway to Severe Tissue Complication Assembly in Bothrops atrox Snakebites.** *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1882, 2019.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. **Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases.** *Toxicon*, v. 34, n. 6, p. 627–642, 1996.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. **Snake venom components and their applications in biomedicine.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 63, n. 24, p. 3030–3041, 2006.

LAUSTSEN, ANDREAS H.; GUTIERREZ, JOSE MARÍA; KNUDSEN, CECILIE; KRISTOFFER H. JOHANSEN; ERICK BERMÚDEZ-MENDEZ; CERNI, FELIPE A; JÜRGENSEN, JONAS A; LEDSGAARD, LINE; MARTOS-ESTEBAN, ANDREA; MIA ØHLENSCHLÆGER; PUS, URSKA; ANDERSEN, MIKAEL R.; LOMONTE,

BRUNO; ENGMARK, MIKAEL; PUCCA, MANUELA B. **Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development.** *Toxicon*, n. 146, p. 151–175, 2018.

LUCIANO, P. M.; SILVA, G. E. B.; AZEVEDOMARQUES, M. M. **Acidente botrópico fatal.** *Revista de Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 42, n. 1, p. 61–65, 2009.

MAGALHÃES, A.; SANTOS, G. B.; VERDAM, M. C. D. S.; FRAPORTI, L.; MALHEIRO, A.; LIMA, E. S.; DOS-SANTOS, M. C. **Inhibition of the inflammatory and coagulant action of Bothrops atrox venom by the plant species Marsypianthes chamaedrys.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 134, n. 1, p. 82–88, 2011.

MEDEIROS, C. R.; HESS, P. L.; NICOLETI, A. F.; SUEIRO, L. R.; DUARTE, M. R.; ALMEIDAS-SANTOS, S. M.; FRANÇA, F. O. S. **Bites by the colubrid snake Philodryas patagoniensis: A clinical and epidemiological study of 297 cases.** *Toxicon*, v. 56, n. 6, p. 1018–1024, 2010.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; MENALDO, D.L.; BERNARDES, C. P.; JACOBFERREIRA, A. L.; NOGUEIRA-SANTOS, C.G.; CASARE- OGASAWARA, T. M.; PEREIRACROTT, L. S. **Effects of Bothrops atrox venom and two isolated toxins on the human complement system: Modulation of pathways and generation of anaphylatoxins.** *Molecular Immunology*, v. 80, p. 91–100, 2016.



MENALDO, D.L.; BERNARDES, C.P.; ZOCAL, K.F.; JACOB-FERREIRA, A.L.; COSTA, T.R.; DEL LAMA, M. P. F. M. **Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a P-I metalloprotease and a phospholipase A2 from Bothrops atrox venom.** *Molecular Immunology*, v. 85, p. 238–247, 2017.

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

MENEGUCCI, R. C.; Bernarde, P. S.; Monteiro, W. M.; Bisneto, P. F.; Neto, P, F.; MAR-TINS, M. **Envenomation by an Opisthoglyphous snake, Erythrolamprus aesculapii (Dipsadidae), in southeastern Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52, 2019.

MESQUITA, P. C. M. D.; PASSOS, D. C.; BORGES-NOJOSA, D. M.; CECHIN, S. Z. **Ecologia e história natural das serpentes de uma área de Caatinga no nordeste brasileiro.** *Papéis Avulsos de Zoologia*. São Paulo, 2013.

MORAIS, J.F.; FREITAS, M.O.W.; YAMAGUCHI, I.K.; SANTOS, M.C.; DIAS DA SILVA, W. **Snake antivenoms from hiperimmunized horses: comparison of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F(ab')₂ fragments.** *Toxicon*, v. 32, n. 6, p. 725734, 1994.

MOREIRA, V., ZAMUNER, S. R., WALLACE, J. L., TEIXEIRA, C. F.

Bothrops jararaca and Crotalus durissus terrificus venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E₂ and D₂, and expression of cyclooxygenases. *Toxicon*, v. 49, n. 5, p. 615–624, 2007.

MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M. C.; NASCIMENTO, N. G.; DA SILVA, H. B.; FERNANDES, C. M.; D'IMPÉRIO, L. M. R. **Local inflammatory events induced by Bothrops atrox snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators.** *Toxicon*, v. 60, n. 1, p. 12– 20, 2012.

MOREIRA, V.; TEIXEIRA, C.; BORGES, S. H.; D'IMPÉRIO, L. M. R.; DOS-SANTOS, M. C. **The crucial role of the MyD88 adaptor protein in the inflammatory response induced by Bothrops atrox venom.** *Toxicon*. v. 67, p. 37-46, 2013.

MOREIRA, V.; TEIXEIRA, C.; SILVA, H. B.; LIMA, D'IMPERIO, M. R.; DOS-SANTOS, M. C. **The role of TLR2 in the acute inflammatory response induced by Bothrops atrox snake venom.** *Toxicon*, v. 118, p. 121–128, 2016.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M.; PEREIRA, N. A. **Plant natural products active against snake bite — the molecular approach.** *Phytochemistry*, v. 55, n. 6, p. 627–642, 2000.

MOURA, V. M., BEZERRA, A. N. S., MOURÃO, R. H. V., LAMEIRAS, J. L. V., RAPOSO, J. D. A., SOUSA, R. L., BOECHAT, A. L., OLIVEIRA, R. B., CHALKIDIS, H. M., DOSSANTOS, M. C. **A comparison of the ability of Bellucia dichotoma Cogn. (Melastomataceae) extract to**



inhibit the local effects of Bothrops atrox venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. *Toxicon*, v. 85, p. 59-68, 2014.

MOURA, V. M., BEZERRA, A. N. S., MOURÃO, R. H. V., LAMEIRAS, J. L. V., RAPOSO, J. D. A., SOUSA, R. L., BOECHAT, A. L., OLIVEIRA, R. B., CHALKIDIS, H. M., DOSSANTOS, M. C. **Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by Bothrops jararaca venom.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 161, p. 224–232, 2015.

MOURA, V. M.; MOURAO, R. H. V. **Aspectos do ofidismo no Brasil e plantas medicinais utilizadas como complemento à soroterapia.** *Scientia Amazonia*, v. 1, p. 17- 26, 2012.

MOURA, V. M.; MOURÃO, R. H. V.; DOSSANTOS, M. C. **Acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil e o uso de espécies vegetais como tratamento alternativo e complementar à soroterapia.** *Scientia Amazonia*. v. 4, n. 1, p. 73–84, 2015.

MUNIZ, E. G.; MARIA, W. S.; ESTEVÃO COSTA, M. I.; BUHRNHEIM, P.; CHAVEZ LORTEGUI, C. **Neutralizing potency of horse antiotherapeutic Brazilian antivenom against Bothrops snake venoms from the Amazonian rain forest.** *Toxicon*. v. 38, n. 12, p. 1859–1863, 2000.

NASCIMENTO, S. P. DO. **Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos no Estado de Roraima, Brasil, entre 1992 e 1998.**

Cadernos de Saúde Pública. v. 16, n. 1, p. 271–276, 2000.

OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. H.; SIFUENTES, D. H. **Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos.** In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, cap. 2. p. 6-21, 2009.

OLIVO, R. A., TEIXEIRA, C. F., WALLACE, J. L., GUTIÉRREZ, J. M., ZAMUNER, S. R. **Role of cyclooxygenases in edema-forming activity of bothropic venoms.** *Toxicon*. v. 49, n. 5, p. 670–677, 2007.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DIÁZ, A. **Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, n. 1–2, p. 233–241, 2000.

PARDAL, P. P. O.; SOUZA, S. M.; MONTEIRO, M. R. C. C.; WEN, F. H.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; TOMY, S. C.; SANO-MARTINS, I. S.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; COLOMBINI, M.; KODERA, N. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; VELARDE, D. T.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. **Clinical trial of two antivenoms for the treatment of Bothrops and Lachesis bites in the north eastern Amazon region of Brazil.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 98, n. 1, p. 28–42, 2004.

PETRETSKI, J. H., KANASHIRO, M. M., RODRIGUES, F. G., ALVES, E. W., MACHADO, O. L. T., KIPNIS, T. L.



Edema Induction by the Disintegrin-like/Cysteine-Rich Domains from a Bothrops atrox Hemorrhagin. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 276, n. 1, p. 29–34, 2000.

PICCININI, A. M.; MIDWOOD, K. S. **DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling.** Mediators of Inflammation. v. 2010, p. 1–21, 2010.

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

PINTO, R. N. L.; DA SILVA, N. J.; AIRD, S. D. **Human envenomation by the South American opisthoglyph Clelia clelia plumbea (Wied).** Toxicon, v. 29, n. 12, p. 1512–1516, 1991.

RIBEIRO, A. E. A. S.; SOARES, J. M. D.; SILVA, H. A. L.; WANDERLEY, C. W. S.; MOURA, C. A.; OLIVEIRA-JUNIOR, R. G.; OLIVEIRA, A. P.; ROLIM, L. A.; COSTA, E. V.; ALMEIDA, J. R. C. S.; OLIVEIRA, H. P.; PALHETA-JUNIOR, R. C. **Inhibitory effects of Morus nigra L. (Moraceae) against local paw edema and mechanical hypernociception induced by Bothrops jararacussu snake venom in mice.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 111, p. 1046–1056, 2019.

RIBEIRO, L. A.; PUERTO, G.; JORGE, M. T. **Bites by the colubrid snake Philodryas olfersii: a clinical and epidemiological study of 43 cases.** Toxicon. v. 37, n. 6, p. 943–948, jun. 1999.

RICHARD, G.; MEYERS, A. J.; MCLEAN, M. D.; ARBABI-GHAHROUDI, M.;

MACKENZIE, R.; HALL, J. C. **In Vivo Neutralization of α -Cobratoxin with High-Affinity Llama Single-Domain Antibodies (VHHs) and a VHH-Fc Antibody.** PLoS One, v. 8, n. 7, 2013.

RUCAVADO, A., ESCALANTE, T., TEIXEIRA, C. F., FERNÁNDES, C. M., DIAZ, C., GUTIÉRREZ, J. M. **Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake Bothrops asper.** Mediators of Inflammation, v. 11, n. 2, p. 121–128, 2002.

RUDNICK, S.I., ADAMS, G.P. **Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting.** Cancer biother. Radiopharm, n. 24, 155-161, 2009.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHOW, V. T. **Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A2.** Bioinformation, v. 8, n. 1, p. 48–57, 2012.

SANZ, L.; FREITAS-LIMA, L. N.; QUESADABERNAT, S.; GRAÇA-DE-SOUZA, V. K.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A.; CALVETE, J. J.; CALDEIRA, C. A. S. **Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: Micrurus frontalis, Micrurus spixii spixii, and Micrurus surinamensis.** Toxicon, v. 166, p. 39–45, 2019.

SARTIM, M. A.; RIUL, T. B.; CISTIA-ANDRADE, C. D.; STOWELL, S. R.; ARTHUR, C. M.; SORGI, C. A.; FACCIOLI, L. H.; CUMMINGS, R. D.; DIAS-BARUFFI, M. **Galatrox is a C-type lectin in Bothrops atrox snake venom that selectively binds LacNAc-terminated glycans and can induce acute inflammation.**



Glycobiology, v. 24; n 11; p. 1010-1021, 2014.

SEGURA, A.; CASTILLO, M. C.; NUÑEZ, V.; YARLEQUE, A.; GONÇALVES, L. R. C.; VILLALTA, M. **Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms.** Toxicon, v. 56, n. 6, p. 980–989, 2010.

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

SHABBIR, A.; SHAHZAD, M.; MASCI, P.; GOBE, G. C. **Protective activity of medicinal plants and their isolated compounds against the toxic effects from the venom of Naja (cobra) species.** Journal of Ethnopharmacology, v. 157, p. 222–227, 2014.

SILVA, A. M.; MENDES, V. K. G.; MONTEIRO, W. M.; BERNARDE, P. S. **Non-venomous snakebites in the Western Brazilian Amazon.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 52, 2019a.

SILVA, K. V.; SAID, R. C.; ASSY, J. G. P. M.; DUARTE, M. R.; TORREZ, P. P. Q.; FRANÇA, F. O. S. **A case of envenomation caused by Oxybelis fulgidus (Serpentes, Colubridae) in Brazilian Amazon.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 52, 2019b.

SILVEIRA, P. V. P.; NISHIOKA, S. A. **Nonvenomous snake bite and snake bite without envenoming in**

a brazilian teaching hospital: analysis of 91 cases. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 34, n. 6, p. 499–503, 1992.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. **Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties.** Toxicon, v. 42, n. 8, p. 855–868, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies.** 1. ed. v. 7, 2018.

SOROKIN, L. **The impact of the extracellular matrix on inflammation.** Nature Reviews Immunology, v. 10, p. 712–723, 2010.

SOUSA, L. F.; NICOLAU, C. A.; PEIXOTO, P. S.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PORTES-JUNIOR, A. P.; MOURÃO, R. H. V.; LIMA-DOS-SANTOS, I.; SANO-MARTIN, I. S., CHALKIDIS, H. M., VALENTE, R. H., MOURA-DA-SILVA, A. M. **Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of Bothrops complex.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 9, p. 2442, 2013.

SOUSA, L. F.; APORTE-JUNIOR, J.; NICOLAU, C. A.; BERNARDONI, L. M.; NISHIYAMA-JR, M. Y.; AMAZONAS, D. R.; FREITAS-DE-SOUZA, L. A.; MOURÃO, R. H.; CHALKIDIS, H.; VALENTE, R. H.; MOURAAS-SILVA, A. **Functional proteomic analyses of Bothrops atrox venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon.** Journal of proteomics, v. 159, p. 32–46, 2017.

TEIXEIRA, C. F., FERNANDES, C.M., ZULIANI, J.P., ZAMUNER, S.F.



Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, n. 1, p. 181–184, 2005.

TEIXEIRA, C. F., LANDUCCI, E. C., ANTUNES, E., CHACUR, M., CURY, Y. **Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2.** Toxicon, v. 42, n. 8, p. 947–962, 2003.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. **Inflammation induced by Bothrops asper venom.** Toxicon, v. 54, n. 1, p. 67–76, 2009.

WALDEZ, F.; VOGT, R. C. **Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil.** Acta Amazonica, v. 39, n. 3, p. 681–692, 2009.

WARRELL, D. A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management, in: Campbell, J. A., Lamar, W. W., Brodie, E. D. (Eds.), **The venomous reptiles of the Western Hemisphere.** 1. ed. Comstock Publishing Associates Ithaca, New York, p. 709-761, 2004.

WEN, F. H. Soroterapia. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, cap. 42. p. 432-445, 2009.

WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.**

2. ed. São Paulo: Sarvier, cap. 4. p. 42-70, 2009.

YU, L.; WANG, L.; CHEN, S. **Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance.** Journal of Cellular and Molecular Medicine. v. 14, n. 11, p. 2592–2603, 2010.

ZAMUNER, S. R.; TEIXEIRA, C. F. P. **Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake Bothrops jararaca.** Mediators of Inflammation. v. 11, n. 6, p. 351–357, 2002.

ZOCAL, K. F.; BITENCOURT, C. D. S.; PAULA-SILVA, F. W. G.; SORGI, C. A.; DE CASTRO, F.; BORDON, K.; ARANTES, E. C.; FACIOLLI, L. H. **TLR2, TLR4 and CD14 Recognize Venom-Associated Molecular Patterns from Tityus serrula- Inflammatory Mediators.** PLoS One. v. 9, **tus to Induce Macrophage-Derived** n. 2, 2014.

CAPÍTULO III

BATISTA, L. T.; SILVA, K. E.; DOS SANTOS, M. C. Plantas Medicinais e Fitoterápicos no sistema de saúde brasileiro: uma revisão da literatura. **Scientia Amazonia**, v. 10, n.2, CS69-CS83, 2021.

Artigo Publicado na Revista Eletrônica Scientia Amazonia.



Plantas Medicinais e Fitoterápicos no sistema de saúde brasileiro: uma revisão da literatura

Luana Travassos Batista⁴; Keyla Emanuelle Ramos da Silva⁵; Maria Cristina Dos-Santos Sobreira de Sampaio³

Resumo

A fitoterapia é um importante recurso terapêutico no tratamento de diversas afecções agudas e crônicas. O seu uso foi regulamentado no Brasil a partir da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Essas duas políticas estimulam o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, em especial no âmbito do Sistema Único de Saúde, de forma segura a seus usuários. A fitoterapia pode ser utilizada na forma de plantas medicinais ou fitoterápicos, o que torna seu uso acessível a população. Pela PNPMF foram instituídos recursos para a criação das Farmácias Vivas que são importantes para o plantio, oferta e distribuição de plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária, além do desenvolvimento de importantes ferramentas para auxiliar os profissionais de saúde na prescrição de fitoterápicos, no país. Nessa revisão foram abordados aspectos do uso da fitoterapia nos serviços de saúde brasileiro, apresentando dados de plantas medicinais e fitoterápicos que são prescritos e estão disponíveis nesses serviços.

Palavras-chave: Fitoterapia; política de saúde; SUS

Medicinal Plants and Herbal Medicines in the Brazilian Health System: a Literature Review. Phytotherapy is an important therapeutic resource in the treatment of a range of acute and chronic illnesses. Its use in Brazil is regulated by the National Policy on Integrative and Complementary Practices (PNPIC) and the National Policy on Medicinal Plants and Phytomedicines (PNPMF). Both these policies encourage the use of medicinal plants and phytomedicines in a way that is safe for users, particularly in the Integrated Health System (SUS). Phytotherapy can use the plant itself or medicines prepared from a plant and is therefore accessible to the public. The PNPMF made resources available not only for the creation of "Living Pharmacies", which are important for the planting, supply, and distribution of medicinal plants and phytomedicines in primary care, but also for the development of tools needed to help healthcare professionals prescribe phytotherapy in Brazil. This review looks at the use of phytotherapy in the Brazilian health-care system and provides data on medicinal plants and phytomedicines that are prescribed and available in the system.

Keywords: Phytotherapy; health policy; SUS

1. Introdução

A criação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

¹ Pós-graduação Imunologia Básica e Aplicada, Lab. Imunoquímica, Depto Parasitologia, ICB/UFAM, Manaus, AM, Brasil. lu.travassos1990@gmail.com

² Profa Associada, FF/UFAM, Manaus, AM, Brasil, Correspondência ramos.keyla@gmail.com

³ Profa Titular Lab Imunoquímica, Depto Parasitologia, ICB, UFAM, Manaus, AM, Brasil, mcsantos@ufam.edu.br

(PNPIC), pela Portaria de Nº 971, de 3 de Maio de 2006, deu início a uma crescente atenção no que diz respeito a fitoterapia no tratamento de diversas afecções. Com essa proposta, a oferta das opções terapêuticas disponíveis aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) incluiu, além de Plantas Medicinais e Fitoterapia, outras terapias alternativas (BRASIL, 2006a). Porém, a introdução da fitoterapia na assistência à saúde, no Brasil, só foi possível devido à aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) pelo Decreto Nº 5.813 no mesmo ano (BRASIL, 2006b) e a partir dessa política, a criação do Programa Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos com o intuito de atingir os objetivos da política.

Apesar do medicamento sintético ser o tratamento convencional, ainda é muito alto o percentual de pessoas que, com base no conhecimento popular, fazem uso de plantas medicinais, isoladamente ou em conjunto com o medicamento (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012). Entre os motivos que levaram a população ao uso de espécies vegetais com fins medicinais, estão a insatisfação com reações adversas causadas pelos medicamentos sintéticos, o baixo custo, a busca por soluções alternativas para as doenças e, ainda, a existência da crença de que tudo que é natural não traz malefícios à saúde, o que favorece o consumo e a aceitação das terapias alternativas, especialmente da fitoterapia (FURNHAM; BHAGRATH, 1993).

São várias as vantagens para implementação da Fitoterapia, entre essas estão a variedade de recursos, uma vez que o tratamento pode ser pelo uso da espécie vegetal fresca, pelo medicamento fitoterápico ou produto tradicional fitoterápico (BRASIL, 2006b). Dessa forma, o material vegetal pode ser facilmente obtido em quintais de casas ou hortas, desde que orientado por profissionais da saúde.

O Brasil possui uma grande biodiversidade, sendo parte desta utilizada para fins medicinais, desde antes da

colonização, pelos habitantes nativos, que tinham nas plantas medicinais o principal meio de cura de suas enfermidades (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012). Dessa forma, uma das diretrizes da PNPMF e o incentivo à pesquisa para o conhecimento e validação do uso de plantas medicinais para o desenvolvimento de fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país (BRASIL, 2006a,b), o que poderá dar ao Brasil um papel de destaque na produção desses medicamentos (CARVALHO et al., 2018).

A PNPMF atende ainda um dos princípios norteadores do SUS, a participação popular (BRASIL, 1990). A população usuária do serviço de saúde do SUS é detentora de extenso conhecimento e experiência sobre o uso tradicional de plantas medicinais e fitoterápicos, e uma perspectiva de troca de informações, que pode levar a aproximação entre a população e os serviços de saúde que oferecem esse tipo de tratamento (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

Embora as espécies vegetais para uso medicinal representem uma alternativa terapêutica, muitas possuem efeitos adversos e podem provocar interações farmacológicas com outras plantas ou com medicamentos sintéticos (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008). Ressalta-se, portanto, a necessidade da utilização da fitoterapia com a orientação de profissionais.

Percebe-se que a uso da fitoterapia, seja na forma de plantas medicinais, produto manipulado ou industrializado é um tema importante para a saúde pública. Embora exista uma política específica para regulamentação, ainda há muita desinformação sobre o tema.

Pelo exposto, o objetivo desse trabalho, foi realizar uma revisão bibliográfica sobre as espécies vegetais oferecidas aos usuários, no sistema de saúde público do Brasil.

2. Metodologia

O objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão da literatura a respeito da prescrição e oferta da fitoterapia nos serviços de saúde brasileiro. A pesquisa bibliográfica foi realizada nos seguintes sites de busca, *Scopus*, *Pubmed/Medline* e *SciELO*, sem período delimitado, além de manuais do ministério da saúde. Foram utilizadas para a busca as palavras-chave: fitoterapia, "fitoterapia no SUS", "sistema de saúde brasileiro", "SUS", "RENAME", "*Aloe vera*", "*Cynara scolymus*", "*Glycine max*", "*Harpagophyllum procumbens*", "*Maytenus ilicifolia*", "*Mentha piperita*", "*Mikania glomerata*", "*Plantago ovata*", "*Rhamnus purshiana*", "*Salix alba*", "*Schinus terebinthifolius*" e "*Uncaria tomentosa*". As buscas foram realizadas no período de setembro de 2020 a Abril de 2021. Para seleção de trabalhos foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: 1) artigos completos publicados 2) Idiomas: inglês e português; 3) trabalhos que abordassem plantas medicinais e fitoterápicos prescritos e ofertados pelo sistema de saúde brasileiro. Os critérios de exclusão foram: 1) teses, dissertações, comunicações em congresso, livros e referências de trabalho; 2) outros idiomas; 3) trabalhos com uso de plantas medicinais e fitoterápicos sem recomendação/prescrição de profissionais da saúde; 4) trabalhos experimentais.

3. Resultados e Discussão

3.1 Utilização da fitoterapia nos serviços de saúde do Brasil

A Fitoterapia é definida como "terapia com plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem utilização de substâncias ativas isoladas" (BRASIL, 2018). Plantas medicinais são caracterizadas como aquelas que produzem princípios ativos capazes de alterar o funcionamento de órgãos e sistemas fisiológicos (ANVISA, 2016). Já, o termo fitoterápico refere-se ao produto derivado de matéria-prima vegetal, com produção técnica, com finalidade

profilática, curativa ou paliativa, não incluindo, portanto, produtos com substâncias ativas naturais ou sintéticas isoladas (BRASIL, 2014a). A Resolução de nº 26/2014 classifica, ainda, os produtos fitoterápicos em duas categorias: medicamento fitoterápico, que possui segurança e eficácia comprovadas por ensaios clínicos e não clínicos e produto tradicional fitoterápico, licenciado pela tradicionalidade de uso.

A inserção de plantas medicinais e fitoterápicos no tratamento de doenças se apresenta como uma alternativa ao modelo biomédico de saúde, porém ainda pouco utilizado nos serviços de saúde tanto públicos quanto privados (GUIZARDI; PINHEIRO, 2008). Para a PNPIC há quatro tipos de produtos que podem ser oferecidos aos usuários do SUS: planta medicinal *in natura*, planta medicinal seca (droga vegetal), fitoterápico manipulado e fitoterápico industrializado (BRASIL, 2015).

O uso de plantas medicinais, drogas vegetais e derivados vegetais foi regulamentada com a criação das Farmácias Vivas, pela Portaria MS de nº 886, de 22 de abril de 2010 (BRASIL, 2010a). A Farmácia Viva se caracteriza por realizar todas as etapas da produção do produto fitoterápico, desde o cultivo, coleta, processamento, armazenamento de espécies vegetais, manipulação e a dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos (ANVISA, 2013). Além das Farmácias Vivas, os fitoterápicos podem ser produzidos pelas farmácias de manipulação do SUS.

No Brasil, vários Estados da Federação já introduziram a fitoterapia nos seus sistemas públicos de saúde. Segundo os dados do Ministério da Saúde do Brasil, em 2016, foram registrados 89.037 atendimentos de Fitoterapia, em 1.205 estabelecimentos de Atenção Básica à Saúde, distribuídos em 822 municípios (Sistema de Informação em Saúde para a Atenção Básica - SISAB), e na Média e Alta complexidade foram registrados 57 serviços em funcionamento, segundo os

dados do Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde (BRASIL, 2017a).

Nos serviços públicos de saúde são ofertados à população, pelos recursos Tripartite: União, Estados e Municípios, doze medicamentos fitoterápicos que constam na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), e são indicados, para uso ginecológico, tratamento de queimaduras, auxiliares terapêuticos de gastrite e úlcera, além de medicamentos com indicação para artrite e osteoartrite. Assim como os demais medicamentos autorizados pela RENAME, cabe aos Estados, Distrito Federal e municípios a seleção, programação, aquisição, armazenamento, controle de estoque e prazos de validade, distribuição e dispensação dos medicamentos e insumos dos fitoterápicos da assistência farmacêutica (BRASIL, 2017b).

Os medicamentos fitoterápicos ofertados foram incluídos na RENAME segundo a Portaria nº 533, de 28 de março de 2012, são estes: *Aloe vera* (babosa), *Cynara scolymus* (alcachofra), *Glycine max* (soja-isoflavona), *Harpagophyllum procumbens* (garra-dodiabo), *Maytenus ilicifolia* (espinheirasanta) *Mentha piperita* (hortelã), *Mikania glomerata* (guaco), *Plantago ovata* (plantago), *Rhamnus purshiana* (cáscara-sagrada), *Salix alba* (salgueiro), *Schinus terebinthifolius* (Aroeirada-praia) e *Uncaria tomentosa* (unhade-gato). Em 2017, houve uma atualização dos medicamentos fitoterápicos ofertados em relação a coluna concentração/composição, que passou a apresentar a quantidade de marcador para cada fitoterápico, e a mesma atualização foi mantida na versão de 2020 (BRASIL, 2020).

Os doze fitoterápicos incluídos na RENAME foram selecionados a partir da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), aprovado em 2009, que lista 71 espécies vegetais, identificadas pelo seu nome científico, de interesse do SUS e prioritárias para realização de pesquisas, para posterior

incorporação de espécies medicinais a RENAME (BRASIL, 2009). As plantas presentes no RENISUS são usadas tradicionalmente no país e consideradas potencialmente úteis para a produção de fitomedicamentos e outros compostos. O RENISUS propõe o cultivo, o gerenciamento, a produção, a comercialização e a distribuição de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2009).

A disponibilidade dos fitoterápicos da RENAME na atenção primária à saúde depende de fatores como, o interesse dos municípios em comprar esses medicamentos, a existência de médicos que estejam habilitados para prescrevê-los, o custo do fitoterápico e sua disponibilidade no mercado, e a prevalência de doenças naquela população que justifiquem sua oferta (CACCIA-BAVA et al., 2017). Além dos fitoterápicos que estão na RENAME, os municípios podem adquirir com recursos próprios, outros fitoterápicos e outras plantas medicinais que não estejam na lista, mas que sejam prescritos por profissionais de saúde. Para isso, é necessário apenas que a equipe da Secretaria de Saúde defina o que será prescrito, adquirido ou manipulado e dispensado (BRASIL, 2014b).

Outra possibilidade do uso de fitoterapia pela população usuária dos serviços de saúde público são as preparações caseiras a partir de plantas medicinais (BRASIL, 2006b). Tais espécies vegetais são de fácil acesso, disponíveis a qualquer hora, normalmente as pessoas têm plantadas em torno de suas casas, e podem ser utilizadas como alternativa para tratar afecções simples, desde que orientadas por profissionais da saúde, que foram capacitados a partir de cursos de formação ou, ainda, buscaram informação na Farmacopeia Brasileira (GUIZARDI; PINHEIRO, 2008).

Os produtos à base de plantas medicinais são seguros para a saúde, quando utilizados corretamente. A ANVISA é a responsável por realizar controle desses medicamentos, sendo responsável por orientar a realização de testagem para

a confirmação da eficácia e dos riscos dos produtos vegetais, e para garantir a qualidade do insumo (ANVISA, 2018).

O Formulário Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira (FFFb) instituído pela PNPMF, em 2011 pela RDC de nº 60/11, que dá suporte às práticas de manipulação e dispensação de fitoterápicos nos Programas de Fitoterapia no SUS, contém formulações utilizadas em serviços de Fitoterapia, com dados de eficácia e segurança embasados na literatura científica. Neste formulário estão presentes monografias de drogas vegetais em infusões, decoctos, tinturas, xarope, géis, pomadas, sabonete, creme, bases farmacêuticas e solução conservante e estão registradas, ainda, informações sobre a forma correta de preparo, indicações e restrições de uso de cada espécie vegetal (BRASIL, 2011a).

Outro documento instituído a partir do FFFb, importante para prescrição de fitoterápicos no SUS, foi o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira (MFFb), criado pela RDC nº 86/16. O objetivo do MFFb foi orientar a prescrição de Fitoterápicos e Plantas Medicinais, pela exposição de evidências científicas, com informações sobre identificação, nomenclatura popular e científica,

parte da espécie vegetal utilizada, indicações terapêuticas, contraindicações, precauções de uso, efeitos adversos, interações medicamentosas, formas farmacêuticas, vias de administração, posologia, tempo de utilização, superdosagem, prescrição, principais classes químicas, segurança, eficácia e referências bibliográficas (BRASIL, 2016).

O conjunto de ações promovidas pela PNPMF permitiu a estruturação da Fitoterapia, em especial, na Atenção Básica no SUS, entre essas a possibilidade de financiamento de medicamentos, pelo

Componente Básico da Assistência Farmacêutica. Além disso, possibilitou a ampliação da abrangência e o escopo das ações da Atenção Básica pelos Núcleos de Apoio à Saúde da Família (NASF), e regulamentou as Farmácias Vivas no SUS, assim como o adequado processamento e manipulação dos Fitoterápicos (BRASIL, 2006b). Por fim, foram estabelecidos guias fitoterápicos e mementos terapêuticos, nas esferas de governo: união, estados e municípios, tais ferramentas auxiliam os profissionais de saúde, na prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos (FONTENELE et al., 2013).

3.2 Plantas medicinais e fitoterápicos no SUS

Os medicamentos fitoterápicos ou plantas medicinais são utilizados para diversas finalidades terapêuticas, como: calmante; estomáquica; anti-inflamatória; indutor do sono; tratamento das afecções do sistema respiratório; circulação sanguínea e circulação periférica; tratamento de sintomas do climatério; hipocolesterolemizante; cicatrizante, além de efeito laxativo, tratamento das afecções do sistema urinário, redução da pressão arterial e hipoglicemizante (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011).

Dos materiais encontrados, foram selecionados os artigos que abordavam o uso da fitoterapia nos serviços de saúde brasileiro. O Quadro 1 apresenta as plantas medicinais e fitoterápicos, encontrados a partir da busca bibliográfica, que são utilizados pelos usuários dos serviços de saúde pública, ou por recomendação, ou por prescrição de profissionais, ou pela disponibilidade nos serviços de saúde, sua indicação e forma de uso.

Quadro 1- Espécies vegetais prescritas/ofertadas nos serviços de saúde público brasileiro.

Nome da espécie	Nome popular/ nome fitoterápico	Indicação	Forma de uso
<i>Plectranthus barbatus</i> Andrews SOUZA et al., 2019; BEZERRA et al., 2020.	Boldo	Distúrbios digestivos, estimulante hepático, estomacal	Chá
<i>Melissa officinalis</i> L. SOUZA et al 2019; BEZERRA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2006	Erva cidreira	Dor de estômago, diarreia, flatulência, dor de cabeça, anti-hipertensivo	Chá/ Cápsula
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. SOUZA et al., 2019	Erva doce	Dor de estômago, ansiolítica, dor abdominal	Chá
<i>Mesosphaerum pectinatum</i> (L.) Kuntze SOUZA et al 2019; BEZERRA et al., 2020	Sambacaitá	Antimicrobiano e anti-inflamatório	Chá/ cataplasma
<i>Mentha spicata</i> L. SOUZA et al., 2019; BEZERRA et al.,2020; OLIVEIRA et al., 2006	Hortelã	Gripe, estimulante do sistema imunológico, flatulência	Chá
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi SOUZA et al., 2019	Aroeira	anti-inflamatório	Chá/ cataplasma
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L. SOUZA et al., 2019; BEZERRA et al., 2020	Mastruz	anti-inflamatório	Chá/ suco/ extrato aquoso
<i>Malva sylvestris</i> L. SOUZA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2006	Malva-branca	Dor de estômago, diarreia, dor de dente	Chá/ xarope caseiro
<i>Matricaria chamomilla</i> L. SOUZA et al., 2019; BEZERRA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2006	Camomila	Flatulência, calmante	Chá
<i>Stryphnodendron barbatimam</i> Mart SOUZA et al 2019	Barbatimão	Antimicrobiano, cicatrização de feridas, coceira vaginal e secreção	Extrato aquoso
		Pressão alta, calmante	Chá
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf. SOUZA et al., 2019; BEZERRA et al.,2020; OLIVEIRA et al., 2006	Capim santo / Capim limão		
<i>Allium sativum</i> SOUZA et al 2019; BEZERRA et al.,2020; OLIVEIRA et al., 2006	Alho	Pressão alta, gripe	Tintura de ervas/ xarope caseiro
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. F. SOUZA et al 2019; BEZERRA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2006	Babosa	Queimaduras, cicatrização de feridas	Gel de folha

<i>Ocimum basilicum</i> L. SOUZA et al 2019; OLIVEIRA et al., 2006	Manjeriçã	Influenza, infecções intestinais, renais e estomacais, insônia, picada de inseto	Chá/ suco/ xarope caseiro
<i>Mikania glomerata Sprengel</i> OLIVEIRA et al., 2006; SOUZA et al.,2019; GASPARETTO et al., 2009	<i>Guaco</i> ®	Broncodilatador e expectorante, afecções do trato respi-,ratório	Xarope
<i>Passiflora sp.</i> BEZERRA et al., 2020	Maracujá <i>/passiflora</i> ®	Calmante	Chá/ Comprimido
<i>Plectranthus amboinicus</i> L. (Sprengel) SILVA et al., 2005; BEZERRA et al., 2020	Malvarico ,	resfriado, gripe, bronquite	Xarope expectorante
<i>Lippia sidoides</i> Cham. SILVA et al., 2005; PEREIRA et al., 2015	Alecrim Pimenta	antisséptico de pele dor muscular	Sabonete/ Capsula/ Tintura
<i>Bauhinia forficata</i> L. SILVA et al., 2005	Mororó	Controle de glicemia	Tintura
<i>Symphytum officinale</i> L. SILVA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006	Confrei	Condições de pele	Pomada
<i>Ageratum conyzoides</i> L. SILVA et al., 2005	Mentrasto	Condições de pele	Pomada
<i>Ocimum gratissimum</i> L. SILVA et al., 2005	Alfavaca	Problemas gastrointestinais	Antisséptico oral
<i>Miracrodruon urundeuva</i> Fr. All. SILVA et al., 2005	Aroeira	Condições ginecológicas/ problemas gastrointestinais	Creme/ elixir
<i>Plectranthus barbatus</i> Andr. SILVA et al., 2005	Malva Santa	Problemas gastrointestinais	Pastilhas estomacais/ Tintura
<i>Cecropia</i> spp. SILVA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006	Torém/ Embaúba	Controle de pressão arterial	Chá
<i>Ageratum conyzoides</i> L. OLIVEIRA et al., 2006	Mentrasto	Anti-inflamatório	Chá
<i>Bauhinia forficata</i> OLIVEIRA et al., 2006	Unha de vaca	Diabetes	Chá
<i>Calendula officinalis</i> . OLIVEIRA et al., 2006	Calêndula	Cicatrizante	Pomada
<i>Maytenus ilicifolia</i> Planch. OLIVEIRA et al., 2006	Espinheira santa	Úlcera gástrica	Chá
<i>Baccharis trimera</i> OLIVEIRA et al., 2006	Carqueja	Digestivo	Infusão
<i>Salvia officinalis</i> OLIVEIRA et al., 2006	Sálvia	Anti-inflamatório	Chá
<i>Phyllonthus niruri</i> L. OLIVEIRA et al., 2006	Quebra pedra	Litíase renal	Infusão

<i>Pantago major</i> L. OLIVEIRA et al., 2006	Tançagem	Diarréia, Anti-inflamatório, Expectorante e broncodilatador (associado ao Guaco para adultos)	Chá
<i>Equisetum sp.</i> OLIVEIRA et al., 2006	Cavalinha	Problemas renais	Chá
<i>Taraxacum officinale</i> OLIVEIRA et al., 2006	Dente de leão	Digestivo	Chá
<i>Justicia pectoralis</i> Jacq. PEREIRA et al., 2015	Chambá	Anti-inflamatório, Expectorante e broncodilatador	Lambedor de chambá

Embora exista uma extensa literatura quanto ao uso da fitoterapia pela população brasileira, são poucos os trabalhos que evidenciam a oferta desse serviço no SUS. Os trabalhos disponíveis, são referentes ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde, em especial aos programas da Estratégia Saúde da Família. A relação com esse nível de atenção deve-se aos fundamentos e princípios desses serviços por estratégia, e pela característica da fitoterapia, que permite a interação entre o saber popular e ações preventivas e de promoção à saúde (BRASIL, 2012).

Pode-se perceber que o emprego da fitoterapia no sistema público brasileiro possui tendência ao uso de plantas medicinais e preparações farmacêuticas das Farmácias Vivas instituídas pelo PNPMF. Segundo o Ministério da Saúde, em 2020, foram investidos R\$ 7,9 milhões em projetos para melhoria do acesso da população a medicamentos fitoterápicos por meio das Farmácias Vivas e, até o momento, já foram apoiados 134 projetos, distribuídos em todo o país, com recursos financeiros destinados à cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2021).

Nessa revisão foram encontradas vinte e cinco espécies, entre uso de plantas medicinais e fitoterápicos, sendo nove dos doze fitoterápicos do RENAME. Em estudo que avaliou a situação da regulamentação de fitoterápicos no Brasil, os autores encontraram 359 produtos fitoterápicos licenciados no Brasil, todos em processo

de registro, sendo 27 em combinação (contendo mais de uma espécie de planta ativa) e 332 como um único produto, e não foi encontrado medicamento tradicional fitoterápico com notificação válida (CARVALHO et al., 2018).

Em relação aos laboratórios farmacêuticos para produção de fitoterápicos licenciados no Brasil, atualmente, existem empresas distribuídas em onze estados brasileiros, sendo a maior parte dessas empresas concentradas na região Sudeste. A região Norte, embora possuidora de uma rica biodiversidade, em especial na Floresta Amazônica, não possui nenhuma empresa com fitoterápico licenciado (CARVALHO et al., 2018).

Quanto aos constituintes vegetais, existem 101 espécies vegetais licenciadas como ingredientes farmacêuticos ativos em fitoterápicos no Brasil, sendo oito nativas endêmicas, nove nativas não endêmicas, seis naturalizadas, seis cultivadas e 62 não são originárias do Brasil (CARVALHO et al., 2018). Apesar da rica biodiversidade brasileira, a maioria dos produtos fitoterápicos produzidos no país, tem como princípios ativos plantas medicinais não nativas. Entre os fatores que podem justificar esses dados estão: um grande número de informações científicas e etnofarmacológicas, e de protocolos de controle de qualidade, segurança e eficácia para espécies não nativas em relação às nativas; escassez de estudos com ensaios clínicos com espécies nativas brasileiras; e a falta de documentação adequada do uso

tradicional para algumas dessas (SANTOS et al., 2011; CARVALHO et al., 2018) além dos entraves e dificuldades impostas por órgãos governamentais, para que os pesquisadores possam validar as espécies vegetais utilizadas tradicionalmente.

Apesar disso, existem muitos estudos avaliando as propriedades biológicas das plantas medicinais nativas da biodiversidade brasileira, mas são poucos os trabalhos que focam na geração de produtos fitoterápicos. Dessa forma, são necessários mais estudos que atendam a legislação sanitária e possuam uma abordagem direcionada ao setor produtivo, gerando mais informações sobre as espécies vegetais nativas e garantindo o registro de mais produtos fitoterápicos (TOLEDO et al., 2003).

Mesmo diante dos incentivos da PNPMF para o emprego das plantas medicinais e fitoterápicos nos serviços de saúde, estudos mostram que os profissionais de saúde detêm pouco conhecimento sobre as propriedades farmacológicas conferidas a esses produtos, o que dificulta as suas prescrições (MATTOS et al., 2018; BEZERRA et al., 2020). Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de material técnico e a capacitação continua desses profissionais para promover o uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos (THIAGO E TESSER, 2011).

3.3 Prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos por profissionais da saúde

A prescrição de medicamentos de forma geral é atribuição de profissionais legalmente habilitados, médicos, médicos veterinários e cirurgiões dentistas, porém outros profissionais, como enfermeiros, farmacêuticos e nutricionistas podem realizar prescrição ou indicação de medicamentos conforme a regulamentação dos seus conselhos profissionais e conforme a RDN de nº 98/2016. Dessa forma, os medicamentos fitoterápicos isentos de prescrição médica podem ser prescritos por profissionais não

médicos e podem ser consultados no Memento Fitoterápico da Farmacopéia Brasileira (MFFB) (BRASIL, 2016).

O profissional médico pode realizar a prescrição de fitoterápicos, no entanto, sua utilização precisa estar fundamentada em bases farmacológicas. O Conselho Federal de Medicina (CFM), pela Resolução de nº 1.499 (BRASIL, 1998), estabelece a proibição de terapias não comprovadas pelos modelos não reconhecidos cientificamente na prática médica, assim é necessário que esses profissionais tenham conhecimento científico da eficácia e segurança dos produtos fitoterápicos para assim prescrevê-los. Já no campo odontológico, o Conselho Federal de Odontologia (CFO) regulamentou pela Resolução de nº 82/08 a habilitação para prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos pelo cirurgião-dentista, reconhecendo o uso de práticas integrativas e complementares a saúde bucal (BRASIL, 2008).

A regulamentação da prática da fitoterapia pelo nutricionista foi determinada pelo Conselho Federal de Nutrição (CFN) em 2013, pela Resolução de nº 525/13, e atribuiu ao profissional as competências para, em modalidades específicas, a prescrição de plantas medicinais, drogas vegetais e fitoterápicos como complemento da prescrição dietética. Essa resolução foi alterada pela Resolução de nº 556/15, redefinindo os critérios de prescrição para os diferentes produtos fitoterápicos, em que: a prescrição de plantas e chás medicinais pelo profissional não requer titulação de especialização na área, enquanto a prescrição de fitoterápicos, produtos tradicionais fitoterápicos e preparações magistrais como complemento dietético só é permitida ao nutricionista com especialização em Fitoterapia (BRASIL, 2015).

A Resolução de nº 625/2020, atualizou no âmbito do Sistema COFEN/COREN, os procedimentos para Registro de Títulos de Pós-graduação *Lato* e *Strictu Sensu* concedido a enfermeiros e aprova a lista de especialidades que incluem a

Enfermagem em Práticas Integrativas e Complementares, dentre estas a Fitoterapia, concedendo ao enfermeiro a possibilidade de obter título de especialista na área (BRASIL, 2018b). Além disso, foi estabelecido pelo ato administrativo do Ministério da Saúde, da Portaria MS de nº 2.488/11, a permissão para prescrição de medicamentos, dentre esses os fitoterápicos, pelo profissional enfermeiro, no âmbito do Programa Saúde da Família (PSF), desde que cumpram os protocolos pré-estabelecidos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2000).

Em relação a atuação do farmacêutico na Fitoterapia, o Conselho Federal de Farmácia (CFF) regulamentou as atribuições deste profissional no uso de plantas medicinais e fitoterápicos pela Resolução de nº 459/07 (BRASIL, 2007). Somado a essa, a Resolução de nº 546/11, permite ao farmacêutico, dentro dos parâmetros legais, a indicação terapêutica de medicamentos fitoterápicos sem prescrição médica, para condições de baixo risco (BRASIL, 2011b). Estará habilitado para essa indicação, o farmacêutico que comprove qualificações como: ter cursado na graduação a disciplina de Fitoterapia, com carga horária mínima de 60 horas, complementada com estágio em manipulação e/ou dispensação de Fitoterápicos e Plantas Medicinais de no mínimo 120 horas; ou título de especialista ou curso de especialização em Fitoterapia que atenda à Resolução de nº 546/11 do CFF. Além dessas resoluções específicas, o CFF publicou duas outras, a Resolução de nº 585/13 e a Resolução de nº 586/13, que regulam a concretização da habilitação do farmacêutico como prescritor em âmbito geral (BRASIL, 2013a, b).

Outro conselho de classe que regulamentou a utilização das PIC para a categoria profissional foi o Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional (COFFITO), de acordo com a Resolução de nº 380/10. Para estar habilitado, o fisioterapeuta deve apresentar títulos que comprovem o

domínio nessas Práticas Integrativas (BRASIL, 2010b). A Fitoterapia e a indicação de substâncias de livres prescrição foram normalizados pelo Acórdão nº 611/17 (BRASIL, 2017b).

A oferta de conteúdo voltado a Fitoterapia e Plantas Medicinais, nos cursos de Graduação ou Pósgraduação, conforme o recomendado pela PNPIC (BRASIL, 2006b), não se faz suficiente para adequada prescrição da Fitoterapia nos serviços de saúde, e assim, o FFFB representa uma ferramenta importante para auxiliar os profissionais da saúde na prescrição correta da fitoterapia.

4. Considerações finais

A população brasileira possui um histórico cultural de utilização de plantas para fins medicinais, isso está relacionado em especial as origens do país e a riqueza de sua flora. Após o estímulo da OMS para a utilização de Terapias Integrativas e a criação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), e ainda a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), a utilização de plantas medicinais e produtos de origem vegetal passou a ser estimulada e regulada no país.

Desde 2006 quando a PNPIC e PNPMF foram implantadas no Brasil, vários Estados e Municípios adotaram o uso de plantas medicinais e fitoterápicos nos serviços de saúde, sendo ofertados, atualmente, várias formas para uso da fitoterapia, sejam estes *in natura*, manipulado ou industrializado. Observou-se, ainda, que as plantas medicinais e fitoterápicos são bem aceitos pela população, como tratamento para várias afecções, em especial pelos usuários do serviço de saúde de atenção básica. Porém, observa-se que apesar das estratégias da PNPMF para a regulamentação do uso de plantas medicinais e fitoterápicos de forma segura aos usuários da saúde, a formação dos profissionais da saúde nessa área ainda é deficiente, dificultando a prática segura

dessa terapia. Conclui-se, portanto, que a Fitoterapia é uma importante terapia integrativa e complementar, porém mais esforços precisam ser feitos para a adequada implementação dessa prática nos serviços de saúde brasileiro.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão de bolsa de Produtividade número 307237/2019-2 a autora Maria Cristina dos Santos Sobreira de Sampaio. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas pelo apoio financeiro concedido no Edital Universal de número 062.00892/2019.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

ANVISA. **Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos**. Brasília, 2018. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/Consolidado_fitoterapicos_2018.pdf/a2f53581-43e5-47bb8731-99d739114e10. Acesso em: 31 mar. 2020.

ANVISA. Resolução RDC nº 18, de 3 de abril de 2013. Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e officinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União de 05 abril de 2013**, Brasília, DF.

ANVISA. Resolução RDC nº 84, de 17 de junho de 2016. Aprova o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira e dá outras providências. **Diário Oficial da União de 20 junho 2016**, Brasília, DF.

BEZERRA, A. S. C. E.; FRANCO, S. P. B., MOUSINHO, K. C.; FONSECA, S. A.; MATOSROCHA, T. J.; PAVÃO, J. M.; SANTOS, A. F. Situational diagnosis of professionals of family health units on phytotherapy. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 3 p.551-556, 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Fitoterápicos. **Ampliação de Farmácias Vivas em todo país**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/ministerio-da-saude-apoia-ampliacao-de-farmacias-vivas-em-todo-o-pais>. Acessado em: 14/04/2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Plantas medicinais e fitoterápicos no SUS**. Brasília, 2017a. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-pnpmpf/plantas-medicinais-e-fitoterapicos-no-sus>. Acesso em: 30 mar. 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2020** [recurso eletrônico], Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília, 2020. 217 p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA-EXECUTIVA; SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. **Glossário temático: práticas integrativas e complementares em saúde**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE; Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso**. 2a. ed. Brasília, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. 1a ed. Brasília: ANVISA, 2011a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Memento Fitoterápico da Farmacopéia Brasileira**. Brasília, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/2909630/Memento+Fitoterapico/a80ec477-bb36-4ae0-b1d2e2461217e06b>. Acesso em: 31 mar. 2020.

BRASIL. Conselho Federal de Enfermagem. Resolução nº 581, de 11 de julho de 2018. Atualiza, no âmbito do Sistema Cofen/Conselhos Regionais de Enfermagem, os procedimentos para Registro de Títulos de PósGraduação Lato e Stricto Sensu concedido a Enfermeiros e aprova a lista das especialidades. **Diário Oficial da União de 28 julho de 2018b**, Brasília, DF.

BRASIL. Conselho Federal de Farmácia. Resolução nº 459, de 28 de fevereiro de 2007. Dispõe sobre as atribuições do farmacêutico no âmbito das plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União de 06 março de 2007**, Brasília, DF.

BRASIL. Conselho Federal de Farmácia. Resolução nº 546, de 21 de julho de 2011. Dispõe sobre a indicação farmacêutica de plantas medicinais e fitoterápicos isentos de prescrição e o seu registro. **Diário Oficial da União de 26 julho de 2011b**, Brasília, DF.

BRASIL. Conselho Federal de Farmácia. Resolução nº 585, de 29 de agosto de 2013. Regulamenta as atribuições clínicas do farmacêutico e dá outras providências. **Diário Oficial da União de 25 setembro de 2013a**, Brasília, DF.

BRASIL. Conselho Federal de Farmácia. Resolução nº 586, de 29 de agosto de 2013. Regula a prescrição farmacêutica e dá outras providências. **Diário Oficial da**

União de 26 setembro de 2013b, Brasília, DF.

BRASIL. Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional. Acórdão nº 611, de 11 de abril de 2017. Normatização da utilização e/ou indicação de substâncias de livre prescrição pelo fisioterapeuta. **Diário Oficial da União de 25 abril de 2017b**, Brasília, DF.

BRASIL. Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional. Resolução nº 380, de 3 de novembro de 2010. Regulamenta o uso pelo Fisioterapeuta das Práticas Integrativas e Complementares de Saúde e dá outras providências. **Diário Oficial da União de 11 novembro de 2010b**, Brasília, DF.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina. Resolução CFM nº 1.499, de 26 de agosto de 1998. Proíbe aos médicos a utilização de práticas terapêuticas não reconhecidas pela comunidade científica. **Diário Oficial da União de 3 setembro 1998**, Brasília, DF.

BRASIL. Conselho Federal de Nutricionistas. Resolução nº 525, de 25 de junho de 2013. Regulamenta a prática da Fitoterapia pelo nutricionista, atribuindo-lhe competência para, nas modalidades que especifica, prescrever plantas medicinais, drogas vegetais e fitoterápicos como complemento da prescrição dietética e, dá outras providências. **Diário Oficial da União de 28 junho de 2013c**, Brasília, DF.

BRASIL. Conselho Federal de Odontologia. Resolução CFO-82, de 25 de setembro de 2008. Reconhece e regulamenta o uso pelo cirurgião-dentista de práticas integrativas e complementares à saúde bucal. **Diário Oficial da União de 1 outubro de 2008**, Brasília, DF.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Presidência da República**. Brasília, DF, 20 set. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica.** Brasília: MS; 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.** Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. 1a. ed. Brasília, DF: 2006b. 60p. (Série B. Textos básicos de saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS/GM nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União de 4 maio de 2006a,** Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União de 22 abril de 2010a,** Brasília, DF.

BRASIL; Departamento de Atenção Básica. **Cadernos de Atenção Básica: programa saúde da família.** 1a ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, 2000.

BRASIL; Ministério da Saúde. **Acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e medicamentos homeopáticos.** 2014. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/component/content/article/737-acoes-e-programas/programa-de-fitoterapico-e-plantas-medicinais/14521-mais-medicos-acesso-a-plantasmedicinais-fitoterapicos-e-medicamentoshomeopaticos>. Acesso em: 31 mar. 2020.

BRASIL; Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. **Diário**

Oficial da União de Maio de 2014, Brasília, DF.

BRASIL; Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS.** 2009a. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-pnpic/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-plantas-medicinais-de-interesseao-sus-renisus>. Acesso em: 16 maio 2020.

BRASIL; Secretaria de Ciência, T. e I. E. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, 2009b.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675–2685, 2012.

CACCIA-BAVA, M. do C. G. G. et al. Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do Estado de São Paulo: resultados do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 5, p. 1651–1659, maio 2017.

CARVALHO, A. C. B.; LANA, T. N.; PERFEITO, J. P. S.; SILVEIRA, D. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology** v. 212, p. 29–35, 2018.

FONTENELE, R. P. et al. Fitoterapia na Atenção Básica: olhares dos gestores e profissionais da Estratégia Saúde da Família de Teresina (PI), Brasil. **Ciência**

& Saúde Coletiva, v. 18, n. 8, p. 2385–2394, ago. 2013.

FURNHAM, A.; BHAGRATH, R. A comparison of health beliefs and behaviours of clients of orthodox and complementary medicine. **The British Journal of Clinical Psychology**, v. 32, n. 2, p. 237–246, maio 1993.

GASPARETTO, J. C.; CAMPOS, F. R.; BUDEL, J. M.; PONTAROLO, R. Mikania glomerata Spreng. e M. laevigata Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627-640, 2010.

GUIZARDI, F. L.; PINHEIRO, R. Novas práticas sociais na constituição do direito à saúde: a experiência de um movimento fitoterápico comunitário. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação**, v. 12, n. 24, p. 109–122, mar. 2008.

MATTOS, G.; CAMARGO, A.; SOUSA, C. A.; ZENI, A. L. B. Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n.11, p.3735-3744, 2018

OLIVEIRA, M.J.R.; SIMÕES, M.J.S.; SASSI, C.R.R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.2, p.39-41, 2006.

PEREIRA, J.B.A.; RODRIGUES, M.M.; MORAIS, I.R.; VIEIRA, C.R.S.; SAMPAIO, J.P.M.; MOURA, M.G.; DAMASCENO, M.F.M.;

SILVA, J.N.; CALOU, I.B.F.; DEUS, F.A.; PERON, A.P.; ABREU, M.C.; MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P. O papel terapêutico do Programa Farmácia Viva e das plantas medicinais no centro-sul

piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.550-561, 2015.

ROSA, C. da; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311–318, jan. 2011.

SANTOS, R.L., et al., Analysis about phytotherapy as an integrating practice in the Brazilian Unified Health System (UHS). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, 2011.

SILVA, M. I. G.; SOUSA, F. C. F.; GONDIM, A. P. S. Herbal Therapy in Primary Health Care in Maracanaú, Ceará, Brazil. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 39, p. 1336-1341, 2005.

SILVEIRA, P. F. da; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618–626, dez. 2008.

SOUZA, A. S.; ANDRADE, W. M. G.; RAMOS, T. S.; FILHO, A. J. S.; FREITAS, A. L.; LIMA, T. C.; ANTONIOLLI, A. R.; SILVA, W. B.; SILVA, F. A. Medicinal Plants in Basic Care: A Study of Clinical Practice. **Pharmacognosy Journal**, v. 11, n. 4, p. 796-802, 2019.

THIAGO, S. C.; TESSER, C. D. Percepção de médicos e enfermeiros da Estratégia de Saúde da Família sobre Terapias Complementares. **Revista Saúde Pública**, v. 45, n. 2, p. 249-257, 2011.

TOLEDO, A. C. O., HIRATA, L. L., MARILENE DA CRUZ, M. B., MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v.21, n.1/2, p.713, 2003.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE *Bellucia dichotoma* Cogn SOBRE O VENENO DE *Bothrops atrox*

Resumo

A serpente *Bothrops atrox* é a principal espécie causadora de acidentes ofídicos na região Amazônica, e as toxinas do veneno são reconhecidas por induzir efeitos inflamatórios no local da picada, que podem evoluir para repercussões sistêmicas graves. Plantas medicinais são comumente utilizadas por comunidades rurais amazônicas para tratamento de envenenamento por serpentes, entre essas a espécie *Bellucia dichotoma*. Este estudo avaliou o potencial de bloqueio sobre vias inflamatórias induzidas pelo veneno de *B. atrox* e o potencial efeito cicatrizante do extrato aquoso de *B. dichotoma*. Os ensaios para avaliar o efeito anti-inflamatório foram realizados em macrófagos diferenciados da linhagem THP-1 e o efeito cicatrizante em fibroblastos humano da linhagem MRC-5. Os resultados encontrados mostram que *B. dichotoma* foi capaz de reduzir a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e da citocina IL-12p70 induzidas pelo veneno de *B. atrox*. Além disso, *B. dichotoma* apresentou efeito antioxidante dose dependente sobre espécies reativas e oxigênio induzidas pelo veneno. Na linhagem de macrófagos testados, o veneno de *B. atrox* não induziu a expressão de COX, portanto, não foi possível avaliar o efeito de *B. dichotoma* sobre essa via inflamatória. O extrato de *B. dichotoma* mostrou potencial cicatrizante, por meio do ensaio de migração celular, em que fibroblastos tratados com o extrato apresentaram um efeito migratório superior ao de células tratadas com o controle vitamina C. Juntos, os resultados mostram o potencial de *B. dichotoma* de reduzir os efeitos inflamatórios locais induzidos por veneno de *B. atrox*.

1. INTRODUÇÃO

O envenenamento ofídico na região Amazônica possui os maiores índices quando comparados às outras regiões do Brasil, e a espécie *Bothrops atrox* é notificada como a principal serpente causadora desses envenenamentos (BRASIL, 2019; 2022). O envenenamento por *B. atrox* é caracterizado por danos teciduais locais e sistêmicos induzidos em suas vítimas (BORGES et al., 1999). Os efeitos locais incluem mionecrose, formação de bolhas, hemorragia e resposta inflamatória intensa, com edema, dor, eritema e equimose e mais severamente, a síndrome compartimental (BORGES et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2018) e as manifestações sistêmicas incluem alterações na coagulação sanguínea e insuficiência renal (FEITOSA et al., 2015a).

Estudos em modelos experimentais sobre os efeitos inflamatórios induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox* sugerem a participação de mediadores inflamatórios protéicos,

como as citocinas, quimiocinas e componentes do Sistema Complemento; lipídicos (eicosanoides), como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos; e influxo leucocitário local na resposta imune ao envenenamento (BARROS et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2009; MOREIRA et al., 2012; 2013; 2016; MENALDO et al., 2017). Em pesquisas clínicas, para avaliar a resposta inflamatória nas vítimas de acidentes botrópico, efeitos semelhantes foram encontrados, com ativação da cascata de imunomediadores e vias de receptores do tipo toll (TLR) associados ao mecanismo de danos teciduais e formação de bolhas (GIMENES et al. 2021) e observação de aumento de citocinas IL-6 e IL-10 e quimiocinas circulantes, como a CXCL-8, relacionados a indução e regulação do perfil da resposta imune, febre e migração celular (AVILLA-AGUERO, 2001; IBIAPINA 2019). Uma análise proteômica do veneno de *B. atrox* mostrou que as metaloproteínases, fosfolipases A₂, serinoproteases e L-aminoácido oxidases são seus principais constituintes (NÚÑEZ et al., 2009; CALVETE et al., 2011), que podem estar associadas ao quadro clínico observado no envenenamento pela espécie (GUERCIO et al., 2006; CALVETE et al., 2011).

Atualmente, o tratamento padrão ao envenenamento por espécies de *Bothrops* sp. é o Soro Antibotrópico (SAB), porém sua eficácia, sobre os efeitos locais do envenenamento pela espécie *B. atrox*, ainda é discutível. Além disso, a utilização de SAB pelas populações rurais e ribeirinhas na região Amazônica enfrenta alguns desafios, como: disponibilidade em localidades mais distantes, dificuldade de acesso aos serviços de saúde equipados para armazenamento e administração desse imunobiológico, além dos próprios desafios relacionados aos riscos de reações de hipersensibilidade (BORGES; SADAHIRO; DOS-SANTOS, 1999; DOS-SANTOS, 2009; WALDEZ E VOGT, 2009; FEITOSA et al., 2015b). Assim, os acidentados fazem uso de plantas regionais, que são utilizadas tradicionalmente ou como coadjuvante à soroterapia ou como medicamento alternativo (MORS et al., 2000; MOURA et al., 2015).

Bellucia dichotoma é uma espécie de planta nativa da região Amazônica apontada como antiofídica por comunidades rurais da região Amazônica (MOURA et al., 2013). Ao ser investigada quanto ao seu potencial de bloqueio sobre a peçonha de serpentes de *Bothrops*, apresentou atividade anti-hemorrágica induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* e anti edematogênica sobre o veneno de *B. atrox*. Os resultados foram ainda mais significativos quando a espécie foi utilizada como coadjuvante ao soro antibotrópico, de acordo com o uso tradicional (MOURA et al., 2014; MOURA et al., 2015; MOURA et al., 2017).

Embora os resultados de outros trabalhos sugiram um perfil anti-inflamatório de *Bellucia dichotoma* sobre o veneno de *Bothrops atrox*, não há estudos que abordem os mecanismos moleculares dos efeitos anti-inflamatórios da espécie. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de ensaios baseados em células e ativação enzimática, o potencial de *Bellucia dichotoma* sobre o estresse oxidativo e produção de mediadores lipídicos e de TNF- α , IL-10 e IL-12 induzidos pelo veneno. Além disso, baseado nas propriedades curativas de *B. dichotoma* para envenenamento botrópico, foi realizado o ensaio *in vitro* de cicatrização celular, a fim de avaliar um possível benefício sobre os danos teciduais locais observados em envenenamentos por espécies de *Bothrops*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

2.1.1 Coleta do Material vegetal

O material vegetal utilizado na pesquisa foi produzido a partir de espécimes coletadas, no período de Março a Maio de 2019, que corresponde ao período chuvoso na região, às 9 horas da manhã, no bairro de Tarumã, na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil, em uma área de floresta tropical de baixa altitude com solo latossólico sendo o local de coleta marcado pelo Sistema Global de Medição de Posição (GPS – GARMIN, Map 60csx, Kansas, EUA): 2°58'46.62"S and 60° 5'20.86"W. Exsiccatas foram confeccionadas para a identificação dos espécimes coletados e depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA, com sob a referência INPA n° 268216.

2.1.2 Preparo do extrato de *Bellucia dichotoma*

O extrato aquoso de *B. dichotoma* foi preparado a partir das informações populares, de acordo com a prática dos moradores de uma comunidade rural em Santarém, Pará (MOURA et al., 2014). O material vegetal de *B. dichotoma* foi submetido à secagem em estufa, moagem e preparo de chá por decocção. Para isto, foram adicionados 50 gramas de pó da casca, obtido por moinho de facas, à água destilada na proporção de 1:10 (m:v) e o preparo submetido a agitação constante de 1.250 rpm, em temperatura de 100° C, até a fervura. O material obtido foi filtrado, liofilizado e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração. Este estudo segue as resoluções do CGEN n° 35/11, com autorização do acesso ao Conhecimento Tradicional

Associado para fins de pesquisa científica sob o número de referência 01450.008934/2014-68 SisGen.

2.2 Obtenção do veneno de *Bothrops atrox*

O veneno foi gentilmente cedido pelo professor MSc. Hipócrates Chalkidis, do Laboratório de Pesquisa Zoológica (LPZ)/ Faculdades Integradas do Tapajós. A peçonha foi extraída de serpentes adultas de *B. atrox*, provenientes da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada no Km 83 da BR-163, Santarém, Pará, Brasil. A coleta de serpentes e a extração do veneno foram aprovadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - nº 14018) e com autorização do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) ref. nº 26/2013. O veneno foi coletado *in natura* e liofilizado no laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, da Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA. Após o processo de liofilização, foi feito um “pool” do veneno e mantido a -20° C, até o momento do uso.

2.3 Avaliação das atividades biológicas do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*.

2.3.1. Atividade bloqueadora da inflamação em células

2.3.1.1 Preparo das Células THP-1 em Cultura

A linhagem celular de monócitos humanos derivados de leucemia monocítica THP-1 foi cultivada em atmosfera úmida, a 37 °C, contendo 5% de CO₂, em meio RPMI (Gibco[®], Life Technologies, EUA) suplementados com 10% de SFB (Gibco[®], Life Technologies, EUA), e antibiótico gentamicina 1% (Gibco[®], Life Technologies, EUA). Para induzir a diferenciação dos monócitos em macrófagos (células aderentes), as células foram ressuspensas em meio novo contendo forbol 12-miristato-13 acetato (PMA) a 10ng/mL (PARK et al., 2007). De acordo com o experimento, as células foram acondicionadas em placas de 24 ou 96 poços, a uma densidade de 1.000.000 ou 100.000 células/poço respectivamente e incubadas por 48h em estufa a 37 °C em 5% de CO₂. Após esse período, os macrófagos aderentes foram tratados com meio RPMI e permaneceram incubadas, nas mesmas condições, por 24h, antes do uso.

2.3.1.2 Realização do ensaio de Alamar Blue

Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método de Alamar Blue, método simples, rápido e sensível, aplicado em larga escala a estudos *in vitro* (NAKAYAMA et al., 1997). O corante azul de alamar na forma oxidada (resazurina) possui coloração azul, com baixa fluorescência intrínseca e entra com facilidade nas células. Na presença de células viáveis é convertido em resofurina, forma reduzida, composto de coloração rosa fluorescente (O'BRIEN et al., 2000). A taxa de intensidade de fluorescência torna possível quantificar o número de células. Foi realizado a exposição da cultura de células as amostras de extrato liofilizado de *B. dichotoma* e veneno de *B. atrox* liofilizado em diferentes concentrações. A determinação da Concentração Inibitória (IC₅₀) das amostras foi realizada utilizando-se concentrações crescentes do extrato de *B. dichotoma* (0,5µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL, 125µg/mL, 250 µg/mL, 500µg/mL e 1000 µg/mL), veneno bruto liofilizado de *B. atrox* e controle negativo de Doxorubicina, nas mesmas concentrações por 24h. Após 24h os sobrenadantes foram desprezados e as células expostas a solução de resazurina na concentração de 3mM (5µL) em meio RPMI (95µL) durante 3h. As análises foram realizadas por avaliação da fluorescência em leitor de placas Glomex com excitação de 560nm e emissão de 590 nm. Sendo linearmente proporcional ao número de células viáveis.

A viabilidade celular foi calculada usando a equação: Viabilidade celular em % = $(F_{\text{final}} - F_{\text{inicial}} \times 100 / F_{\text{controle}})$. Onde: F_{final} = intensidade de fluorescência de células tratadas final; F_{inicial} = intensidade de fluorescência de células tratadas inicial; F_{controle} = intensidade de fluorescência das células só com o meio de cultura. Os resultados obtidos foram calculados em escala logarítmica e analisados no software GraphPad Prisma 7.0 para obtenção da dose IC₅₀ (índice de citotoxicidade que causa 50% de morte celular).

2.3.1.3 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (iROS)

Os níveis de iROS foram analisados por meio da sonda fluorescente 2',7'-Acetato Diclorofluoresceína (DCFDA) (WOLFE; LIU; HAI, 2007). O DCFDA é utilizado para avaliar os níveis intracelulares de ROS devido a sua capacidade de atravessar facilmente as membranas celulares em uma forma detectável, formada através de reações de hidrólise catalisada pela esterase intracelular. As células THP-1 foram plaqueadas, após o período de incubação para diferenciação foram marcadas com a sonda DCFDA a 25µM por 45 minutos, em seguida a sonda foi removida e as células desafiadas com veneno de *B. atrox* na dose que corresponde a IC₅₀ e tratadas com extrato de *B. dichotoma* nas concentrações de 50, 10 e 1

$\mu\text{g/mL}$ por um hora a 37°C em 5% de CO_2 , ao abrigo da luz (FIGUEROA; ASADUZZAMAN; YOUNG, 2018). Foi realizado também análise com adição das mesmas concentrações do extrato de *B. dichotoma* com desafio peróxido de hidrogênio (H_2O_2) $200 \mu\text{M}$ por 1 hora. A quercetina ($50 \mu\text{M}$) foi utilizada como controle positivo e células sem tratamento para controle negativo. Foi medido o nível de fluorescência em leitor de placas (Chameleao TM V Multitecnológico) com emissão de 485nm e excitação de 535nm .

2.3.1.4 Avaliação do bloqueio da expressão de COX induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*

A inibição da expressão de COX total, COX-1 e COX-2 foi obtida usando um kit de ensaio de triagem de inibidor fluorescente de COX (Cayman Chemical, MI, EUA). A medição foi realizada de acordo com o manual do fabricante. Para isso, células THP-1 na concentração de 3×10^6 receberam desafio com veneno de *Bothrops atrox* na dose que corresponde a IC_{50} ($527,8 \mu\text{g/mL}$) e tratamento de *Bellucia dichotoma* nas concentrações de 50, 10 e $1 \mu\text{g/mL}$ e por 24 horas. A quantidade de COX foi analisada medindo a fluorescência em leitor de placas (Chameleao TM V Multitecnológico) com excitação de 535nm e emissão de 587nm . Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata.

2.3.1.5 Citometria de fluxo para avaliação da expressão de citocinas

Para avaliar o potencial do extrato de *Bellucia dichotoma* em inibir a expressão e a atividade biológica de citocinas de perfil pró-inflamatório $\text{TNF-}\alpha$, anti-inflamatória IL-10 e IL-12p70 para perfil Th1, *in vitro*, foi empregada a citometria de fluxo. Células THP-1 foram expostas aos seguintes estímulos: veneno de *Bothrops atrox* na concentração de $527,8 \mu\text{g/mL}$ (IC_{50}); extrato de *B. dichotoma* na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$; LPS $1 \mu\text{g/mL}$; DMSO a 1%; controles PMA e meio RPMI, e os tratamentos com extrato de *B. dichotoma* + veneno de *B. atrox* e extrato de *B. dichotoma* + LPS, nas mesmas concentrações dos estímulos. Após os estímulos e tratamentos as células foram incubadas em estufa úmida por 24 horas a 37°C , contendo 5% de CO_2 por 24 h. Para avaliação em citometria de fluxo, foram adicionados $2 \mu\text{L}$ de brefeldina e $10 \mu\text{L}$ de ionomicina em cada poço, 4 horas antes do término dos tratamentos. Após esse período de incubação o sobrenadante foi descartado e realizado a soltura mecânica das células, posteriormente transferidas para o tubo de citometria. Aos tubos foi adicionado tampão de lise, e em seguida realizado lavagens com PBS-Wash e a permeabilização das células com PBS-P. Após a permeabilização, o sobrenadante foi novamente descartado e realizado a marcação intracelular com anti- $\text{TNF-}\alpha$ e anti-IL-10 para avaliar o perfil pró-

inflamatório e anti-inflamatório das amostras, e a anti-IL12p70 para avaliar perfil Th1. Após a marcação foi realizada a leitura das amostras no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Bioscience), no software FACS Diva 6.0, após os dados brutos foram analisados no software FlowJo 10.1. A seleção da região de interesse (R1) foi realizada em gráficos de distribuição em pontos (*dot plot*) de tamanho celular relativo (*Forward angle light scatter* – FSC) versus granulosidade celular (*Side angle light scatter* – SSC), de onde foram excluídos tanto restos como grumos celulares através da análise de *single cells* (FSC-A/FSC-H), sendo analisados um mínimo de 30 mil eventos por amostra.

2.3.2 Avaliação da atividade cicatrizante *in vitro*

2.3.2.1 Avaliação da citotoxicidade em células MRC-5

A linhagem celular MRC-5 (fibroblasto humano) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil, e mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL). As células foram mantidas incubadas a 37 °C com atmosfera umidificada com 5% de CO₂. A citotoxicidade do extrato seco de *B. dichotoma*, foi avaliada pelo método Alamar blue segundo Nakayama et al. (1997). As células foram plaqueadas na concentração de 5 x 10³ células/poço em placas de 96 poços. Após 24 de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com o extrato na concentração de 50 µg/mL, durante um período de 72 horas. Como controle positivo de morte, foi avaliada a citotoxicidade da Doxorrubicina (25 µg/mL) e controle negativo DMSO (0,2%).

2.3.2.2 Realização do ensaio de motilidade celular

Para avaliação da capacidade de migração celular foi utilizado o método descrito por Liang; Park; Guan (2007). O ensaio baseia-se na criação de uma área de descontinuidade, por raspagem (“arranhão”), em uma monocamada de células confluentes, em que as células da borda irão mover-se para fechar completamente o novo espaço criado, ou seja, uma ferida, e o acompanhamento do seu fechamento. Para a realização do ensaio, as células MRC-5, fibroblastos humano, foram transferidas para placas de 24 poços, na densidade de 50 x 10⁴ células/poço e as mesmas foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C a 5% de CO₂. Após 24 h, foi realizada a descontinuidade das células contidas nos poços, com o auxílio de uma ponteira estéril de 1-200µL, fazendo um risco no meio da monocamada de células. Em

seguida, foi adicionado o tratamento com extrato aquoso de *B. dichotoma* nas concentrações não tóxicas de 0,5, 1 e 5 µg/mL por 24 h. Para o controle negativo foi utilizado DMSO (0,2%) e para o controle positivo, Vitamina C na concentração de 5 µM. A migração celular foi avaliada por meio de fotografias, na qual se mensurou a área lesionada nos momentos de 0, 24 e 48 h. As imagens foram capturadas com câmera digital acoplada ao microscópio invertido de fase e foram obtidas do mesmo campo de visão da ferida, criando pontos de referência na parte externa da placa e na platina do microscópio.

2.4. Análise estatística

Utilizou-se Análise de Variância com um fator ou dois fatores (ANOVA One-Way ou Two-Way), de acordo com o delineamento experimental, utilizando-se o teste de Tukey para comparação pós-teste. A correção de Bonferroni foi aplicada para correção de comparações múltiplas. As curvas de IC₅₀ foram obtidas por regressão não-linear. Os dados foram expressos como média e desvio padrão, nível de significância adotado de 5%. Os gráficos foram gerados utilizando-se o software GraphPad Prisma.

3. RESULTADOS

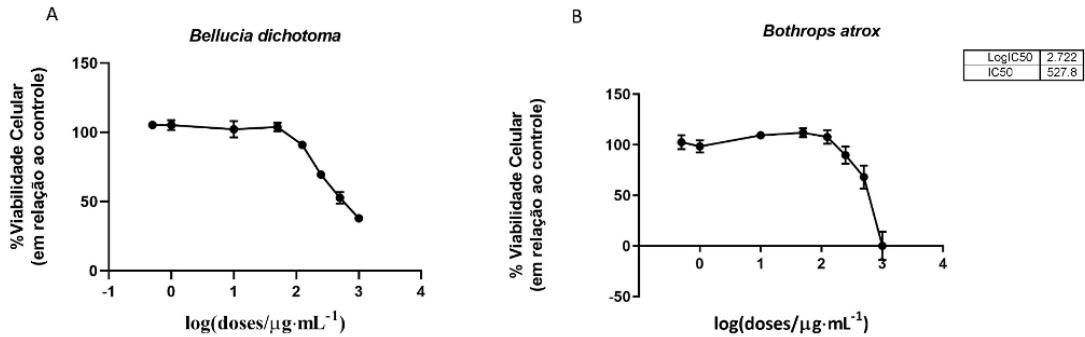
3.1 Rendimento do material vegetal

O rendimento médio do material liofilizado foi de 7,56%. Após a obtenção do extrato aquoso liofilizado foram realizados os ensaios para avaliação do potencial anti-inflamatório da planta.

3.2 Ensaio de Citotoxicidade em cultura de células THP-1

Em relação ao efeito citotóxico do extrato de *Bellucia dichotoma* e veneno de *Bothrops atrox* em THP1 por 24 h, através do ensaio de Alamar Blue, foi observado que o uso de extrato de *B. dichotoma* até a concentração de 50 µg/mL não afetou significativamente a viabilidade das células THP-1 e apenas a concentração 1000 µg/mL apresentou maior toxicidade aos macrófagos THP-1 (Fig 1A). Por outro lado, o veneno de *B. atrox* na dose 1000 µg/mL foi capaz de levar a 100% da morte celular em 24 horas, sendo a IC₅₀ estimada na concentração 527,8 µg/mL (Fig 1B). Foi utilizado a doxorrubicina, nas mesmas concentrações, como controle de morte, com IC₅₀ de 14 µg/mL. O DMSO na concentração de 1% não foi capaz de induzir morte celular.

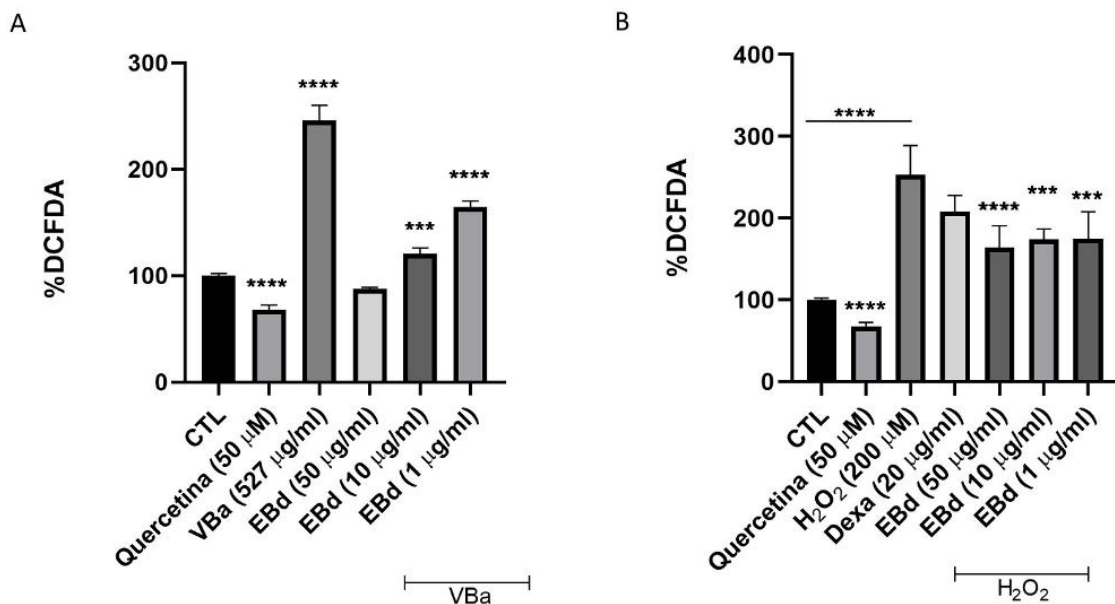
Figura 1: Determinação de citotoxicidade do extrato de *Bellucia dichotoma* e do veneno de *Bothrops atrox* em macrófagos THP-1 pelo ensaio Alamar Blue. Diferentes concentrações do extrato de *Bellucia dichotoma* (A) e veneno de *Bothrops atrox* (B) foram avaliados por 24h.



3.3 Efeito do extrato de *Bellucia dichotoma* sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular (iROS)

Na Figura 2, pode-se observar que o extrato de *Bellucia dichotoma* apresentou eficácia na inibição da produção de iROS induzida pelo veneno (A) e pelo H_2O_2 (B), de forma dose dependente. O antioxidante quercetina apresentou efeito antioxidante basal.

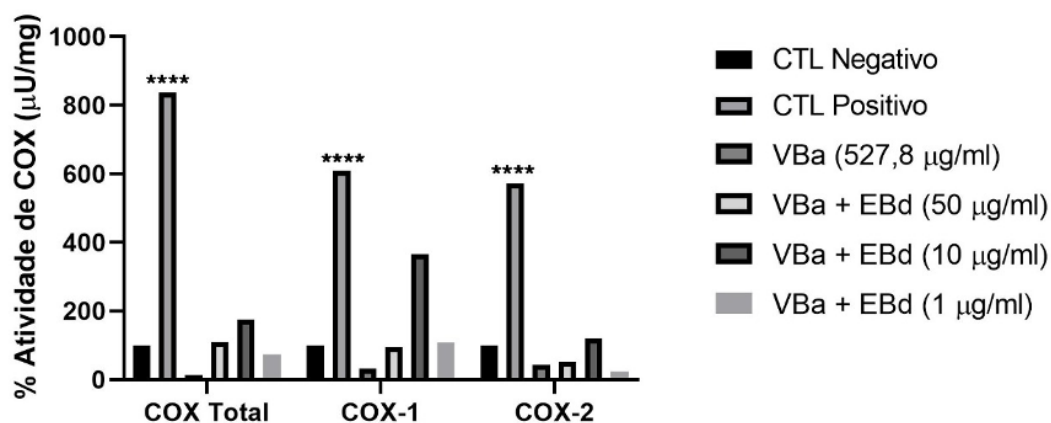
Figura 2: Efeito do extrato de *Bellucia dichotoma* sobre a produção de iROS em macrófagos THP-1. O tratamento com *Bellucia dichotoma* foi avaliado em estímulo com veneno de *Bothrops atrox* (A) e com H_2O_2 (B), por 1 hora. Onde: CTL (controle negativo), VBa (veneno de *Bothrops atrox*), EBd (extrato de *Bellucia dichotoma*), Quercetina (antioxidante padrão), Dexa (dexametasona). **** diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$.



3.4 Bloqueio da expressão de COX

Conforme mostrado na Figura 3, o veneno de *Bothrops atrox* não foi capaz de induzir atividade expressiva de COX nas células avaliadas, e conseqüentemente não foi possível mensurar o bloqueio da expressão de COX-1 e COX-2 para o extrato.

Figura 3: Efeito do extrato de *Bellucia dichotoma* sobre a produção de COX total, COX-1 e COX-2 em macrófagos THP-1 desafiados com veneno de *Bothrops atrox*. Controle negativo corresponde a células sem tratamento e o controle positivo, solução padrão fornecido pelo kit do ensaio. Onde: VBa (veneno de *Bothrops atrox*); EBd (extrato de *Bellucia dichotoma*). **** diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$.



3.5 Ensaio de quantificação de citocinas

Através de um gráfico de ponto (*dot plot*) delimitado na região R1 (Figura 4), pode ser observado que as células do controle negativo, meio sem PMA, não apresentaram descolamento (Figura 4A), permanecendo no lado direito e as células do controle positivo veneno de *Bothrops atrox* apresentaram deslocamento para o lado esquerdo, caracterizado pelo dano e morte das células (Figura 4B), demonstrando a efetividade dos controles. Foi observado ainda, que o tratamento com *B. dichotoma* das células THP-1 desafiadas com veneno de *B. atrox* reduziu essa resposta (Figura 5).

Figura 4: Marcação em citometria de fluxo de macrófagos THP-1 controle negativo (A) e controle positivo (B).

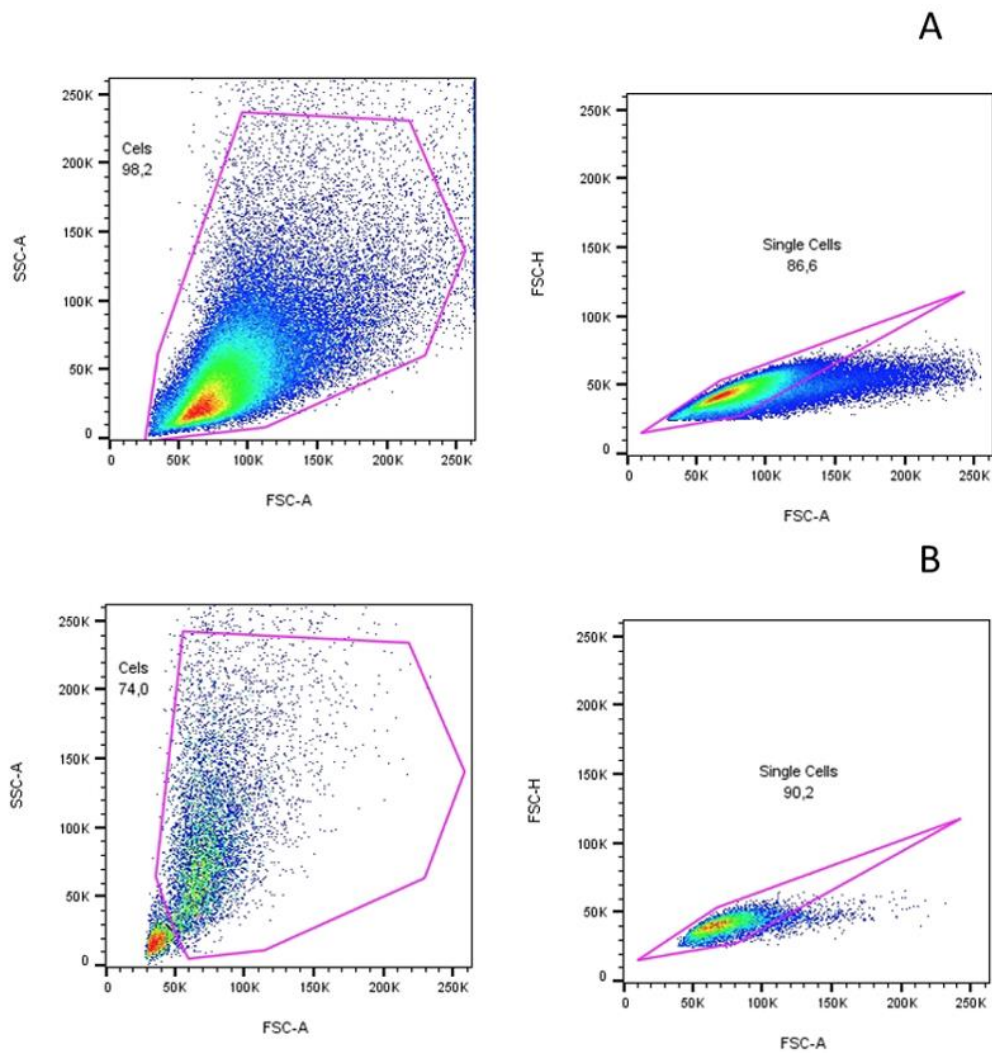
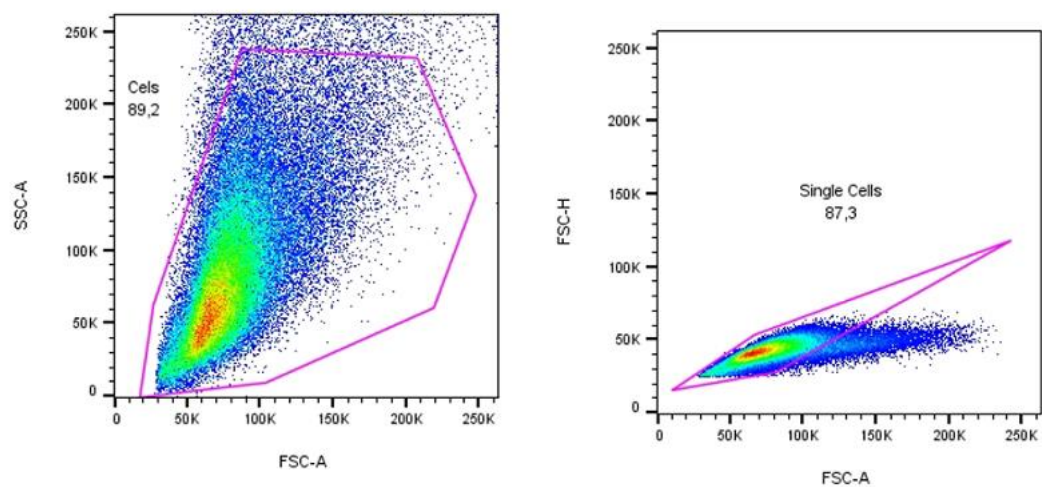
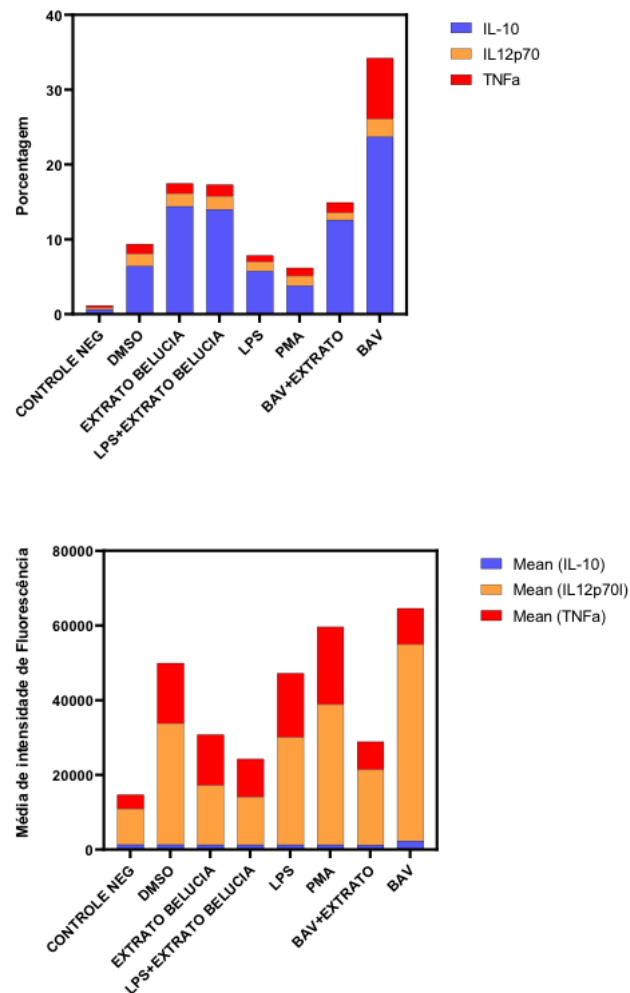


Figura 5: Marcação em citometria de fluxo de macrófagos THP-1 desafiadas com veneno de *Bothrops atrox* e tratadas com extrato de *Bellucia dichotoma*.



Na Figura 6 são demonstrados a expressão de citocinas de células THP-1 expostas a diferentes desafios e tratamentos. Células tratadas com o veneno de *Bothrops atrox* tiveram alta produção de TNF- α , IL-10 e IL-12p70, células que receberam tratamento somente com o extrato não demonstraram aumento expressivo das citocinas de forma geral, enquanto as tratadas com desafio veneno + extrato apresentaram uma redução nos níveis de TNF- α e IL-12 em relação ao desafio veneno. Foi realizado ainda desafio com LPS, mostrando um perfil de aumento de citocinas, e quando adicionado o extrato observou-se uma redução da citocina pró-inflamatória TNF- α e da citocina IL-12p70 que induz perfil Th1. Foram realizados controle de meio e do PMA, mostrando que este, usado para diferenciar as células em macrófagos, induz estresse nas células, com aumento da produção de citocina pró-inflamatória. Células tratadas com o veneno, além de mostrarem alteração na produção de citocinas, pelo estresse celular, mostraram uma mudança da morfologia, com diminuição do tamanho celular, quando comparadas aos controles.

Figura 6: Efeito dos desafios veneno de *Bothrops atrox* e LPS, e tratamento com extrato de *Bellucia dichotoma* na produção de TNF- α , IL-12p70 e IL-10 por macrófagos THP-1. A) Porcentagem de células com produção de citocinas em diferentes desafios. B) Média da intensidade de fluorescência para produção de citocinas por células em diferentes desafios.



3.6 Ensaio de Motilidade celular

O ensaio de motilidade celular tem por objetivo observar os efeitos de migração e proliferação em fibroblastos, células envolvidas no processo de cicatrização tecidual. Os resultados obtidos demonstram que o extrato de *Bellucia dichotoma* nas concentrações 0,5, 1 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contribuíram para efeito proliferativo que pode favorecer o potencial de cicatrização (Fig. 7) e as concentrações 1 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram um potencial proliferativo 20% mais eficaz que o padrão vitamina C ($p < 0,05$) (Fig. 8).

Figura 7: Efeito proliferativo do extrato de *Bellucia dichotoma* e do controle positivo vitamina C no ensaio de motilidade celular com linhagem MRC-5, nos tempos 0, 24 e 48h após a exposição ao tratamento.

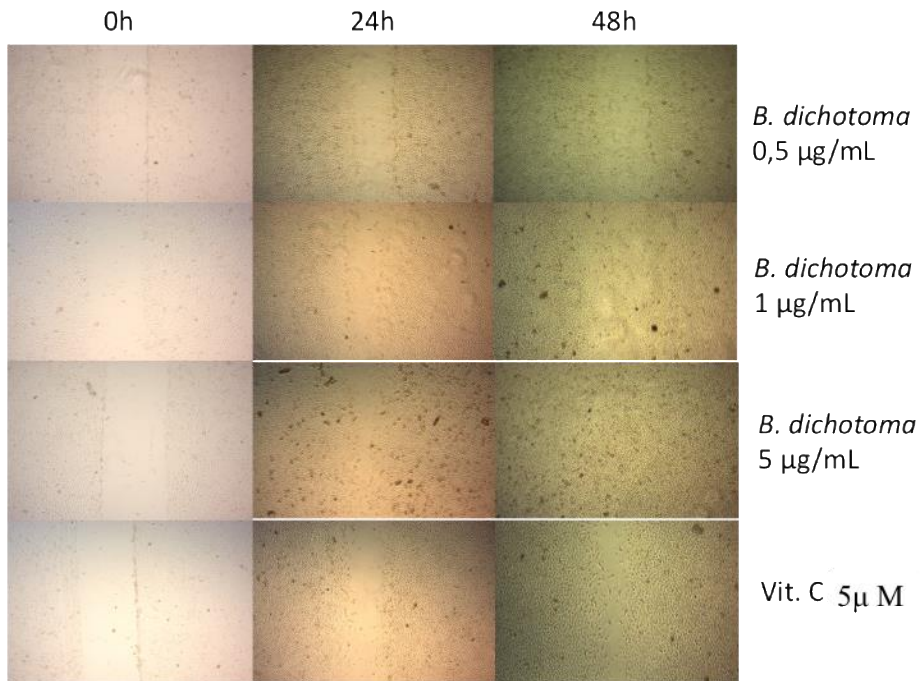
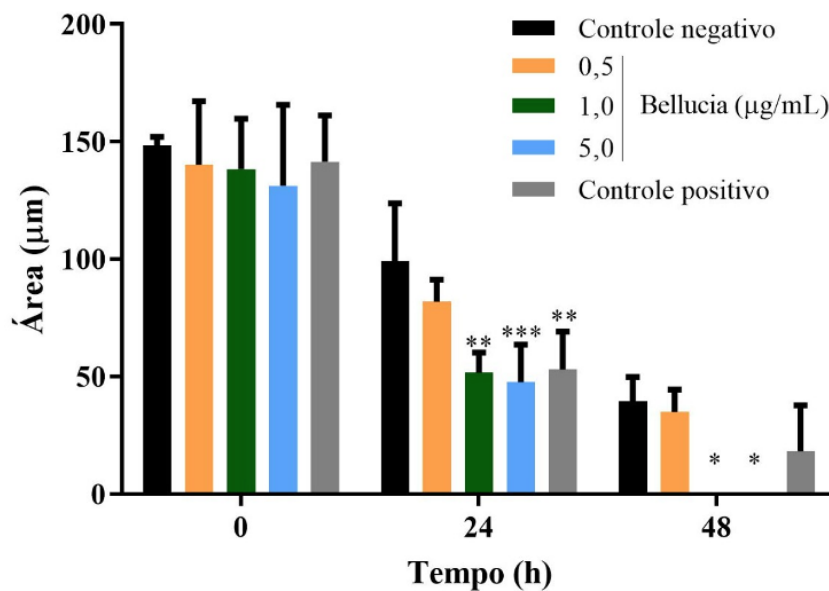


Figura 8: Efeito do extrato de *Bellucia dichotoma* sobre a motilidade celular de MRC-5 em relação aos controles, nos tempos de tratamento 0, 24 e 48h. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado a Vitamina C por ANOVA Two way seguido de Bonferroni posttest.



4. DISCUSSÃO

Bellucia dichotoma, espécie nativa da região Amazônica, conhecida popularmente como muúba ou goiaba-de-anta, é comumente utilizada pela população para fins medicinais, em especial para o tratamento de envenenamentos ofídicos. A partir do uso popular, foi observado em trabalhos anteriores o potencial antiofídico das cascas dessa espécie vegetal. O extrato aquoso de *B. dichotoma*, preparado como chá por decocção, forma utilizada pela população, quando testado em protocolos que simulavam o uso tradicional, ou seja, extrato aquoso por via oral, mostrou a capacidade de reduzir edema de pata induzido por veneno de *Bothrops atrox* em ensaios *in vivo* (MOURA et al., 2014; MOURA et al., 2017). No presente estudo, investigou-se as possíveis ações inibidoras da inflamação induzida por veneno de *B. atrox* em macrófagos da linhagem THP-1 e o efeito cicatrizante do extrato aquoso de *B. dichotoma in vitro*.

A inflamação é a primeira resposta que ocorre após dano ou infecção. O envenenamento das serpentes do gênero *Bothrops* sp. é caracterizado pela capacidade das toxinas presentes no veneno de ativar diretamente células inflamatórias circulantes ou localizadas nos tecidos (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000; MOURA-DA-SILVA et al., 2007;) ou indiretamente pelo reconhecimento de produtos de dano tecidual causados pela ação de componentes do veneno (RUCAVADO, 2016) ou fragmentos de dano celular (ALMEIDA et al., 2020). Células leucocitárias ativadas liberam uma ampla gama de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, quimiocinas que estão envolvidas na resposta imune e reparo tecidual. Por outro lado, a reação inflamatória exacerbada intensifica o dano tecidual enquanto reduz os mecanismos de reparo, contribuindo para o aparecimento de complicações locais em envenenamentos ofídicos, dentre essas o edema que pode progredir para necrose, síndrome compartimental, déficit funcional e amputação (GUTIERREZ et al., 2018; SOUZA et al., 2018). Estudos em modelos experimentais mostram que a síntese e liberação substancial de mediadores inflamatórios proteicos (citocinas, quimiocinas e proteínas do Sistema Complemento) e lipídicos (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) estão entre os mecanismos envolvidos nos efeitos inflamatórios locais induzidos pelo veneno de *B. atrox* (BARROS et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004; MOREIRA et al., 2012; MENALDO et al., 2017).

Primeiramente, realizou-se a avaliação de citotoxicidade em cultura de células do extrato de *Bellucia dichotoma* e do veneno de *Bothrops atrox*, para que fosse possível identificar as concentrações do extrato que não fossem capazes de causar danos/estresse as

células, e, portanto, avaliar as possíveis propriedades bloqueadoras do extrato sobre o veneno. Em relação ao veneno, foi determinado a dose capaz de causar maior estresse às células, e assim, avaliar os efeitos protetivos do extrato. A linhagem celular de macrófagos THP-1, células leucêmicas imortalizadas de origem humana, mostrou uma IC₅₀ de 527,8 µg/mL para o veneno de *B. atrox*. Já as linhagens MRC-5, de fibroblastos humanos, utilizadas no ensaio de cicatrização celular, tiveram até a dose 50 µg/mL testadas quanto a viabilidade, podendo observar assim a capacidade de o extrato de *B. dichotoma* não inibir o crescimento celular. Foi possível observar que o extrato de *B. dichotoma* não apresenta efeito citotóxico significativo em diferentes linhagens celulares. A investigação de atividades biológicas em células fibroblastos humanos MRC-5 com extrato de *B. dichotoma* já foi realizada em outro trabalho, mostrando que essas células também não tiveram efeitos citotóxicos observados (MOURA et al., 2017). São escassos os trabalhos avaliando citotoxicidade de *B. dichotoma* em linhagens de macrófagos, sendo esses dados relevantes, por ser um grupo de células frequentemente utilizadas em ensaios para avaliar ação bloqueadora de inflamação, mostrando-se como uma alternativa para o uso de animais.

O envenenamento ofídico pode ocorrer pela ação direta das toxinas presentes no veneno sobre células, tecidos, plasma ou matriz extracelular, ou ainda pela geração de efeitos endógenos no organismo, que resultam na fisiopatologia do envenenamento (GUTIERREZ, 2021). Dessa forma, foi proposto que a ação do veneno nos tecidos desencadeia a geração de padrões moleculares associados a danos (DAMP), que ao interagirem com o sistema imune inato promovem a geração de mediadores com múltiplas ações (ZORNETA et al., 2012; MOREIRA et al., 2016), e o conceito de padrões moleculares associados ao veneno (VAMP), em que se propõem que os componentes do veneno podem ativar diretamente as células da resposta imune inata (ZOCCAL et al., 2014). Portanto, a investigação de recursos terapêuticos para reduzir as ações tóxicas do veneno se baseiam na capacidade de bloqueio de receptores ou das vias intracelulares relacionados a ações de DAMP e VAMP. No presente trabalho, foi avaliado o potencial de bloqueio do extrato de *B. dichotoma* sobre o veneno de *B. atrox* através da quantificação de iROS, de citocinas pró e anti-inflamatórias, e bloqueio na expressão de COX.

Os macrófagos desempenham papel fundamental na iniciação e propagação da resposta inflamatória (POLTORAK et al., 1998; KANNO et al., 2006). Ao serem estimulados, os macrófagos da linhagem THP-1 ativada, podem liberar diferentes mediadores inflamatórios, entre eles ROS, citocinas e mediadores lipídicos (SZEKANECZ; KOCH, 2007;

QI et al., 2013). O ROS, predominantemente produzido nas mitocôndrias, atua como mensageiro que regula diferentes vias de transdução de sinalização intracelular e atividades de fatores de transcrição (SANO et al., 2021). Pelo estresse oxidativo, pode ocorrer a ativação do Fator Nuclear-KB (NF-KB) que é um importante fator de transcrição de citocinas pró-inflamatórias (YOKOO; KITAMURA, 1996; BHAT et al., 1998). Dessa forma, são comumente implicados no desenvolvimento de doenças inflamatórias, por serem capazes de promover eventos que desencadeiam a inflamação (FILIPPIN et al., 2008; BUREK; ROSE, 2008; ZHOU et al., 2011; BULUA et al., 2011). Os envenenamentos estão associados à geração de espécies reativas de oxigênio nos tecidos afetados, e dessa forma, o uso de antioxidantes tem sido proposto como recurso terapêutico complementar (SHARMA et al., 2015).

Macrófagos THP-1 apresentaram níveis de iROS aumentados significativamente após o estímulo com veneno de *Bothrops atrox* e com o estímulo H₂O₂, em comparação com o grupo controle, e tiveram uma redução na produção quando tratados com *Bellucia dichotoma*, de maneira dose dependente. Esses resultados evidenciam o efeito antioxidante de *B. dichotoma* sobre a produção de ROS, que pode representar um importante recurso terapêutico sobre o estresse oxidativo induzido pelo envenenamento ofídico. Resultados do efeito antioxidante do extrato de *B. dichotoma* foram encontrados em outro trabalho utilizando o modelo de estudo de radical livre DPPH e em cultura de células MRC-5, onde os autores atribuíram o propriedade antioxidante à provável ação de compostos fenólicos do metabolismo secundário da espécie (MOURA et al., 2017). Esses resultados corroboram com o potencial antioxidante de *B. dichotoma* encontrado em células THP-1, o que pode contribuir com sua atividade anti-inflamatória.

Embora outros estudos *in vitro*, tenham mostrado a expressão de COX induzida por substâncias desencadeadoras de inflamação, como o LPS, no presente estudo não foi encontrado aumento da expressão enzimática de COX-1 e COX-2 induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox* em células THP-1, quando comparados ao controle negativo (ANWAR et al., 2011; MACEDO et al., 2021). No entanto, em estudo realizado *in vivo* para avaliar a expressão de COX induzido pelo veneno de *B. atrox*, os autores encontraram um aumento acentuado de COX-2 e da produção de prostaglandinas, tromboexamos e leucotrienos em leucócitos peritoneais, após 1 a 4 horas da injeção de veneno na cavidade peritoneal de camundongos (MOREIRA et al., 2012). Vale ressaltar que em outro estudo foi observado por

Western blot, que a expressão de COX foi fortemente aumentada pelo PMA, utilizado para diferenciação de monócitos THP-1 em macrófagos (LE et al., 2014).

A avaliação e quantificação de citocinas são consistentemente empregados em estudos pré-clínicos e clínicos, como marcadores de ativação e/ou supressão da resposta imune. Dessa forma, foi realizada por citometria de fluxo a detecção intracelular das citocinas TNF- α , IL-10 e IL12p70, expressas em macrófagos diferenciados em cultura celular, induzidos por veneno de *Bothrops atrox*. Os resultados encontrados mostram o aumento das citocinas TNF- α , IL-10 e IL12 induzidas por veneno de *B. atrox*, e a redução destas quando tratadas com extrato de *B. dichotoma*. TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, que contribui com aumento do influxo leucocitário ativando e estimulando a maturação de células polimorfonucleares, e regula positivamente a expressão de moléculas de adesão endotelial (SEDGWICK et al., 2000; FASSHAUER et al., 2003) e IL-12p70 desempenha papel importante para uma resposta imune do tipo Th1, além de ser potente estímulo para células *natural killer* (NK) e células TCD8+ (THINCHIERI, 2003). Enquanto IL-10 está relacionada ao controle do processo inflamatório, inibindo a expressão de enzimas e mediadores pró-inflamatórios (HOWARD; O 'GARRA, 1992). Portanto, o aumento de IL-10 induzida pelo veneno de *B. atrox*, observado em macrófagos diferenciados em cultura celular, pode estar relacionado a uma tentativa de controle do processo inflamatório e inibição de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α (HOWARD; O 'GARRA, 1992; HERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2008).

O uso de plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas é mencionado em vários estudos experimentais, pré-clínicos e clínicos com extratos vegetais, látex, óleos vegetais ou fitoterápicos, em diferentes formas, como pomadas, géis e membranas (NAYAK et al., 2009; ESTEVÃO et al., 2013; BINÍC et al., 2010; SILVA et al., 2015; PEREIRA et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2017). Em relação a *Bellucia dichotoma*, são escassos na literatura pesquisas experimentais que atribuam à espécie essa atividade biológica. Neste estudo, foi possível observar o potencial de cicatrização do extrato de *B. dichotoma*, por meio do estímulo à migração e proliferação de fibroblastos MRC-5, com resultados estatisticamente superiores a vitamina C, utilizado como padrão. A migração de fibroblastos é uma fase fundamental para a cicatrização de feridas, por desempenharem um papel importante na produção e deposição dos componentes da matriz extracelular, entre os quais, o colágeno (CHEN et al., 2014; DESJARDINS-PARK et al., 2018). O potencial cicatrizante de *B. dichotoma* pode estar relacionado a constituição química do metabolismo secundário. Em trabalho que avaliou o perfil químico de *B. dichotoma*, foi observado que os taninos são o

grupo de fenóis predominantes no extrato aquoso dessa espécie (MOURA et al., 2017). Os taninos são compostos que se caracterizam pela sua capacidade adstringente, e o potencial cicatrizante desse grupo pode estar relacionado a formação de uma camada protetora, complexo tanino-proteína ou polissacarídeo e tecidos epiteliais lesionados (OKUDA; ITO, 2011; SU et al., 2017).

CONCLUSÕES

Em conjunto, este estudo mostrou que o extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* pode reduzir os efeitos inflamatórios induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox*. O tratamento com o extrato aquoso pode reduzir o estresse oxidativo, assim como a inflamação, pela produção de ROS em células THP-1 desafiadas com o veneno. Não foi possível avaliar o efeito do extrato de *B. dichotoma* sobre a produção de COX *in vitro*, pelas células incubadas com o veneno de *B. atrox*. O extrato também possui ação sobre mediadores protéicos, com ação inibitória sobre a produção de citocina pró-inflamatória TNF- α , e citocina IL-12p, induzidas pelo veneno de *B. atrox*. Além disso, o extrato de *B. dichotoma* mostrou um efeito proliferativo em células de fibroblastos humanos, sugerindo seu efeito cicatrizante. Esses achados mostram o potencial do extrato aquoso de *B. dichotoma* em bloquear os efeitos pró-inflamatórios induzidos pelo veneno de *B. atrox* e seu potencial cicatrizante.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, M. T.; FREITAS-DE-SOUSA, L. A.; COLOMBINI, M.; GIMENES, S. N.; KITANO, E. S.; FAQUIM-MAURO, E. L.; SERRANO, S. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Inflammatory reaction induced by two metalloproteinases isolated from *Bothrops atrox* venom and by fragments generated from the hydrolysis of basement membrane components. **Toxins**, v. 12, n. 96, p. 1–12, 2020.
- ANWAR, K.; VOLOSHYNA, I.; LITTLEFIELD, M.J.; CARSONS, S.E.; WIRKOWSKI, P.A.; JABER, N.J.; SOHN, A.; EAPEN, S.; REISS, A.B. COX-2 Inhibition and Inhibition of Cytosolic Phospholipase A2 Increase CD36 Expression and Foam Cell Formation in THP-1 Cells. **Lipids**, v. 46, p. 131–142, 2011.
- AVILA-AGUERO, M. L.; PARIS, M. M.; HU, S.; PETERSON, P. K.; GURIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. **Pediatric Emergency Care**, v. 17, n. 6, p. 425–429, 2001.
- BARROS, S. F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V. L.; KIPNIS, T. L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators Inflammatory**, v. 7, p. 339–346, 1998.

BHAT, N. R.; ZHANG, P.; LEE, J. C.; HOGAN, E. L. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. **Journal of Neuroscience**, v.18, n. 5, p. 1633–1641, 1998.

BINIC, I.; JANKOVIC, A.; JANKOVIC, D.; JANKOVIC, I.; VRUCINIC, Z. Evaluation of Healing and Antimicrobiological Effects of Herbal Therapy on Venous Leg Ulcer: Pilot Study. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 2, p. 277–282, 2010.

BORGES, C. C.; SADAHIRO, M.; DOS-SANTOS, M. C. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 637–646, 1999.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por animais peçonhentos – serpentes. Situação epidemiológica**. 2018. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13712-situacao-epidemiologica-dados>. Acessado em Julho de 2020.

BRASIL; Ministério da Saúde. **Acidente por Animais Peçonhentos. Sistema de Informação e Agravo de Notificação. Dados epidemiológicos e Estatísticas**. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos>>. Acesso em: 28 jul. 2020.

BUREK, C. L.; ROSE, N. R. Autoimmune thyroiditis and ROS. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n.7, p. 530–537, 2008.

BULUA, A. C.; SIMON, A.; MADDIPATI, R.; PELLETIER, M.; PARK, H.; KIM, K.; SACK, M. N.; KASTNER, D. L.; SIEGEL, R. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 3, p. 519–533, 2011.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PEREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; GUTIERREZ, J. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H.; FURTADO, M. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: pedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal Proteome**, v.74, n. 4, p. 510–527, 2011.

CHEN, J. C.; LIN, B.; HU, H.; LIN, C.; JIN, W.; ZHANG, F.; ZHU, Y.; LU, C.; CHEN, R. NGF Accelerates Cutaneous Wound Healing by Promoting the Migration of Dermal Fibroblasts via the PI3K/Akt-Rac1-JNK and ERK Pathways. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

DESJARDINS-PARK, H. E.; FOSTER, D. S.; LONGAKER, M. T. Fibroblasts and Wound Healing: An Update. **Regenerative Medicine**, v. 13, n. 5, p. 491–495, 2018.

DOS-SANTOS, M.C. **Serpentes peçonhentas e ofidismo no Amazonas**. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.).

Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 11. p. 132–142.

ESTEVÃO, L. R.; MEDEIROS, J. P.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, R. S.; MENDONÇA, F. S.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28 n. 12, p. 863–869, 2013.

FASSHAUER, M.; KLEIN, J.; LOSSNER, U.; PASCHKE, R. Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. **Hormone and Metabolic Research**, v. 35, n. 3, p. 147–152, 2003.

FEITOSA, E. L.; SAMPAIO, V.; SALINAS, J.; QUEIROZ, A.; SILVA, I. M.; GOMES, A. A.; SACHETT, J.; SIQUEIRA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DOS-SANTOS, M. C.; LACERDA, M.; MONTEIRO, W. Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: a case-control study. **Plos one**, v. 10, n. 7, p. 1–15, 2015a.

FEITOSA, E. L.; SAMPAIO, V.; SACHETT, J.; CASTRO, D. B.; NORONHA, M. D.; LOZANO, J. L.; MUNIZ, E.; FERREIRA, L. C.; LACERDA, M. V.; MONTEIRO, W. M Snakebites as a largely neglected problem in the Brazilian Amazon: highlights of the epidemiological trends in the State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 34–41, 2015b.

FIGUEROA, D.; ASADUZZAMAN, M.; YOUNG, F. Real time monitoring and quantification of reactive oxygen species in breast cancer cell line MCF-7 by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 94, p. 26–33, 2018.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Redox signalling and the inflammatory response in Rheumatoid Arthritis. **Clinical Experimental Immunology**, v. 152, n. 3, p. 415–422, 2008.

GIMENES, S. N.; SACHETT, J. A.; COLOMBINI, M.; FREITAS-DE-SOUSA, L. A.; IBIAPINA, H. N.; COSTA, A. G.; SANTANA, M. F.; PARK, J.; SHERMAN, N.; FERREIRA, L. C.; WHEN, F.; MONTEIRO, W. MOURA-DA-SILVA, A. M.; FOX, J. W. Observation of *Bothrops atrox* Snake Envenoming Blister Formation from Five Patients: Pathophysiological Insights. **Toxins**, v. 13, n. 11, p. 1–13, 2021.

GUÉRCIO, R. A.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LOPEZ-LOZANO, J. L.; PABA, J.; SOUSA, M. V.; RICART, C. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science**, v. 4, n. 1, p. 1–14, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; HERRERA, C.; FERNANDEZ, J.; LOMONTE, B.; FOX, J. 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.; ALBULESCU, L.; CLAREM R. H.; CASEWELL, N. R.; EL-AZIZ, T. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. The Search for Natural and Synthetic Inhibitors

That Would Complement Antivenoms as Therapeutics for Snakebite Envenoming. **Toxins**, v.13, n. 451, 2021.

HERNANDEZ A. CRUZ, S. GARCIA-JIMENEZ, R. ZUCATELLI MENDONC; V. L. PETRICEVICH. Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Release in Mice Injected with *Crotalus durissus terrificus* Venom. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, p. 1–10, 2008.

HOWARD, M.; O'GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. **Immunology Today**, v. 13, n. 6, p. 198–200, 1992.

IBIAPINA, H. N.; COSTA, A. G.; SACHETT, J. A.; SILVA, I. M.; TARRAGO, A. M.; NEVES, J. C.; KERR, M. W.; SANTANA, M. F.; MARTINS-FILHOS, O. A.; LACERDA, M. V.; FERREIRA, L. C.; MALHEIRO, A.; MONTEIRO, W. M. An immunological stairway to severe tissue complication assembly in *Bothrops atrox* snakebites. **Frontier in Immunology**, v. 10, n. 1882, p. 1–13, 2019.

KANNO, S.; SHOUJI, A.; TOMIZAWA, A.; HIURA, T.; OSANAI, Y.; UJIBE, M.; OBARA, Y.; NAKAHATA, N.; ISHIKAWA, M. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. **Life Science**, v. 78, n. 7, p. 673–681, 2006.

LE, M. Q.; KIM, M. S.; SONG, Y. S.; NOH, W. N.; CHUN, S. C.; YOON, D. Y. The Water-Extracted *Ampelopsis brevipedunculata* Downregulates IL-1b, CCL5, and COX-2 Expression via Inhibition of PKC-Mediated JNK/NF- κ B Signaling Pathways in Human Monocytic Cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 126, n. 4, p. 359–369, 2014.

LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 2, p. 329–333, 2007.

MACEDO, T.; FERRERES, F.; PEREIRA, D.; OLIVEIRA, A.; GOMES, N.G.; GIL-ISKIERDO, A.; VALENTÃO, P.; ARAUJO, L.; ANDRADE, P.B. Cassia sieberiana DC. leaves modulate LPS-induced inflammatory response in THP-1 cells and inhibit eicosanoid-metabolizing enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 1-9, 2021.

MENALDO, D. L.; BERNARDES, C.; ZOCCAL.; JACOB-FERREIRA, A. L.; COSTA, T.; DEL LAMA, M. P.; NAAL, R. M.; FRANTZ, F. G.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V. Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a P-I metalloprotease and a phospholipase A2 from *Bothrops atrox* venom. **Molecular Immunology**, v. 85, p. 238–247, 2017.

MOREIRA, V.; SDOS-ANTOS, M. C.; NASCIMENTO, N. G.; DA SILVA, H. B.; FERNANDES, C. M.; LIMA, M. R.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12-20, 2012.

MOREIRA, V. T., C., SILVA, H.B., D'IMPÉRIO LIMA, M.R., DOS-SANTOS, M.C. The crucial role of the MyD88 adaptor protein in the inflammatory response induced by *Bothrops atrox* venom. **Toxicon**, v. 67, p. 37–46, 2013.

MOREIRA, V. T.; D'IMPÉRIO, C. L.; DA SILVA, M. R.; BORGES, H.; DOS-SANTOS, M. C. The role of TLR2 in the acute inflammatory response induced by *Bothrops atrox* snake venom. **Toxicon**, v. 118, p. 121-128, 2016.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

MOURA, V. M.; BEZERRA, A. N.; MOURÃO, R. H.; LAMEIRAS, J. L.; RAPOSO, J. D.; SOUSA, R. L.; BOECHAT, A. L.; OLIVEIRA, R. B.; CHALKIDIS, H. M.; DOS-SANTOS, M. C. A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. **Toxicon**, v. 85, p. 59-68, 2014.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A.; DOS-SANTOS, M. C.; RAPOSO, J. D.; LIMA, A. E.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, M. N.; MOURÃO, R. H. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 224-232, 2015.

MOURA, V. M.; SOUZA, L. Y.; GUIMARÃES, N. C.; SANTOS, I. G.; ALMEIDA, P. D.; OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H.; DOS-SANTOS, M. C. The potential of aqueous extracts of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of *Bothrops atrox* venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 196, p. 168-177, 2017.

MOURA-DA-SILVA A, BUTERA D, TANJONI I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2893-2905, 2007.

NAKAYAMA, G. R., CATON, M. C., NOVA, M. P., PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, p. 205-208, 1997.

NAYAK, S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 3, p. 351-356, 2009.

NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; TORRE, P. D.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 57-78, 2009.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants-Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. **Molecules**, v. 16, 2191–2217, 2011.

OLIVEIRA, S. S.; SAMPAIO, V.; SACHET, J. A.; ALVES, E. C.; SILVA, V. C.; LIMA, J.; A.; SILVA, I. M.; FERREIRA, L. C.; FAN, H. W.; LACERDA, M. V.; MONTEIRO, W. M. **Snakebites in the Brazilian Amazon: Current Knowledge and Perspectives**. In: Vogel, CW., Seifert, S., Tambourgi, D. (eds) *Clinical Toxinology in Australia, Europe, and Americas*. Toxinology. Springer, Dordrecht. p.73–99, 2018. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7438-3_61

PARK, E. K.; JUNG, H. S.; YANG, H. I.; YOO, M. C.; KIM, C.; KIM, K. S. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflammation Research**, v. 56, p. 45–50, 2007.

PEREIRA, L. P.; MOTA, M. R.; BRIZENO, L. A.; NOGUEIRA, F. C.; FERREIRA, E. G.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF- α , IL-1 β , NO, TGF- β . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 213–223, 2016.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M. Y.; HUFFEL, C. V.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 1998.

QI, Z.; YIN, F.; LU, L.; SHEN, L.; QI, S.; LAN, L.; LUO, L.; YON, Z. Baicalein reduces lipopolysaccharide induced inflammation via suppressing JAK/STATs activation and ROS production. **Inflammation**, v. 62, n. 9, p. 845–855, 2013.

RUCAVADO, A.; NICOLAU, C. A.; ESCALANTE, T.; KIM, J.; HERRERA, C.; GUTIERREZ, J. M.; FOX, J. W. Viperid envenomation wound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. **Toxins**, v. 8, n. 349, p. 1–13 2016.

SANO, M.; FUKUDA, K.; SATO, T.; KAWAGUCHI, H.; SUEMATSU, M.; MATSUDA, S.; KOYASU, S.; MATSUI, H.; YAMAUCHI-TAKIHARA; K.; HARADA, M.; OGAWA, S. ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. **Circulation Research**, v. 89, n. 8, p. 661–669, 2001.

SHARMA, R. D.; KATKAR, G. D.; SUNDARAM, M. S.; PAUL, M.; NAVEENKUMAR, S. K.; SWETHAKUMAR, B.; HEMSHEKHAR, M.; GIRISH, K.; KEMPARAJU, K. Oxidative stress-induced methemoglobinemia is the silent killer during snakebite: A novel and strategic neutralization by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 2, p. 240–254, 2015.

SILVA, L. M.; BOEING, T.; SOMENSI, L. B.; CURY, B. J.; STEIMBACH, V. M.; SILVEIRA, A. C.; NIERO, R.; FILHO, V. C.; SANTIN, J. R.; ANDRADE, S. F. Evidence of gastric ulcer healing activity of *Maytenus robusta* Reissek: *In vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 75–85, 2015.

SOUZA, A. S.; SACHET, J. A.; ALCANTARA, J. A.; FREIRE, M.; ALECRIM, M. G.; LACERDA, M.; FERREIRAM L. C.; FAN, H. W.; SAMPAIO, V. S.; MONTEIRO, W. M. Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. **Toxicon**, v. 145, p. 15–24, 2018.

SU, X.; LIU, X.; WAANG, S.; LI, B.; PAN, T.; LIU, D.; WANG, F.; DIAO, Y.; LI, K. Wound-healing promoting effect of total tannins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in rats. **Burns**, v. 43, n. 4, p. 830–838, 2017.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A. E. Macrophages and their products in Rheumatoid Arthritis. **Current Opinion Rheumatology**, v. 19, p. 289–295, 2007.

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

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133–146, 2003.

VASCONCELOS, M. S.; SOUZA, T. F.; FIGUEIREDO, I.; SOUSA, E. T.; SOUSA, F. D.; MOREIRA, R. A.; ALENCAR, N. M. A phytomodulatory hydrogel with enhanced healing effects. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 4, p. 688–697, 2018.

WALDEZ, F.; VOGT, R. C. Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 681–696, 2009.

WOLFE, K.; LIU, L.; HAI, R. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8896–8907, 2007.

YOKOO, T., KITAMURA, M. Dual regulation of IL-1 beta-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF-kappa B and AP-1. **American Journal Physiology**, v. 270, p. 123–130, 1996.

ZHOU, R.; YAZDI, A. S.; MENU, P.; TSCHOPP, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 221–225, 2011.

ZOCCAL, K. F.; BITENCOURT, C. S.; PAULA-SILVA, F. W.; SORGI, C. A.; BORDON, K. C.; ARANTES, E. C.; FACCIOLI. TLR2, TLR4 AND CD14 RECOGNIZE VENOM-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS FROM TITYUS SERRULATUS TO INDUCE MACROPHAGE-DERIVED INFLAMMATORY MEDIATORS. **PLOS ONE**, V. 9, N. 2, P. 1–12, 2014.

ZORNETTA, I.; CACCIN, P.; FERNANDEZ, J.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. Envenomations by *Bothrops* and *Crotalus* snakes induce the release of mitochondrial alarmins. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, 2012.

CAPÍTULO IV

(Artigo e patente a serem submetidos)

POTENCIAL ANTIOFÍDICO DE UM GRANULADO EFERVESCENTE A BASE DE *Bellucia dichotoma*

Resumo

Bellucia dichotoma é uma espécie vegetal utilizada por comunidades da região Amazônica, na medicina tradicional, para tratamentos de acidentes por serpentes. As cascas dessa espécie vegetal são preparadas na forma de chá e utilizadas por via oral após acidentes. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram o potencial antiofídico dessa espécie frente ao veneno de *Bothrops atrox*. A partir dessas informações, este estudo teve o objetivo de desenvolver uma forma farmacêutica sólida granulada efervescente, seguro e eficaz com potencial anti-inflamatório. Primeiramente, os extratos de *B. dichotoma*, preparados de modo similar ao utilizado pelas populações locais da região Amazônica, chá por decocção, foi avaliado quanto a toxicidade em ensaio pré-clínico. Em seguida, foi desenvolvido um granulado efervescente a base do extrato de *B. dichotoma*, caracterizado quanto a estabilidade térmica, umidade e características organolépticas, e testado quanto a atividade anti-edematogênica em edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops atrox*. Os resultados encontrados mostram que *B. dichotoma* não apresentou efeitos tóxicos no ensaio de toxicidade aguda. Portanto, de acordo com a ANVISA, a espécie vegetal pode ser usada para a elaboração de um fitoterápico. O granulado efervescente produzido apresentou estabilidade físico-química, boa efervescência e sem grande alteração quando comparadas a análise pré-formulação. O ensaio pré-clínico do granulado efervescente mostrou efeito anti-inflamatório no modelo edema de pata, e essa atividade foi mais eficaz na dose 566,6 mg/kg, com resultados similares ao controle positivo soro antibotrópico. A formulação placebo não apresentou atividade anti-inflamatória e não foi observado diferença estatística entre os tratamentos com soro e fitoterápico administrados simultaneamente. Dessa forma, este estudo mostra a potencialidade do extrato de *B. dichotoma* para desenvolvimento de um agente anti-inflamatório oral promissor, seguro e eficaz para tratamento de pacientes acidentados por serpentes *Bothrops atrox*.

1. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais representam um importante recurso terapêutico em todo o mundo. O uso dos produtos vegetais para fins medicinais pode ocorrer pelo consumo *in natura*, na forma de chá, infusão ou formulações fitoterápicas, ou como mistura em alimentos (POHL et al., 2016). Em áreas rurais, o uso de plantas medicinais corresponde, em muitos casos, a única forma de acesso à atenção primária a saúde (WHO, 2007).

Comumente conhecida como goiaba de anta, *Bellucia dichotoma* Cogn. é uma árvore nativa da região Amazônica, pertencente à família das Melastomaceae. A espécie apresenta porte médio e com frutos comestíveis que são utilizados para produção de sucos ou doces caseiros (KINUPP; LORENZI, 2014) e as cascas do tronco utilizadas, pela população, para fins medicinais (MOURA et al., 2013; 2015). Trabalhos anteriores evidenciaram propriedades

antiofídicas de *B. dichotoma*, quando utilizadas conforme o uso popular (MOURA et al., 2014; 2015; 2017).

Com base em seu uso na atenuação dos efeitos locais do envenenamento botrópico, a casca de *Bellucia dichotoma* tem sido investigada e estudos relatam sua capacidade de inibir a resposta inflamatória, em modelos *in vitro* e *in vivo* da doença. Moura et al. (2014) relataram efeitos inibitórios sobre a fosfolipase A₂ após a exposição aos extratos aquosos obtidos da casca de *B. dichotoma*. Em outro estudo, os extratos de espécimes coletadas em diferentes localizações geográficas reduziram significativamente o edema de pata em modelo murino, induzido por veneno de *Bothrops atrox* (MOURA et al., 2017).

O uso de formulações fitoterápicas possui vantagens em relação às plantas medicinais *in natura*, visto que precisam atender às exigências de legislação sanitária. Medicamentos fitoterápicos devem possuir segurança e eficácia baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade, e os produtos tradicionais fitoterápicos possuem segurança e efetividade baseados em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e de uso sob vigilância de profissional médico (BRASIL, 2014). Dessa forma, é possível garantir a qualidade da matéria-prima vegetal, reduzir os riscos de intoxicação e de contaminação por micro-organismos.

Sendo assim, neste estudo o extrato de *Bellucia dichotoma* foi avaliado quanto à toxicidade, para verificar possível risco à saúde, e posteriormente foi desenvolvida uma forma farmacêutica sólida, granulado efervescente. A atividade farmacológica dessa formulação fitoterápica foi avaliada em modelo, *in vivo*, de edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops atrox*, com objetivo de demonstrar sua aplicação terapêutica, com base no uso tradicional, validado em estudos publicados na literatura científica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

2.1.1 Coleta do Material vegetal

Cascas de *Bellucia dichotoma* coletadas no período de Março a Maio de 2019, na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil, em uma área de floresta tropical de baixa altitude com solo latossólico sendo o local de coleta marcado pelo Sistema Global de Medição de Posição (GPS – GARMIN, Map 60csx, Kansas, EUA): 2°58'46.62"S and 60° 5'20.86"W, foram utilizadas para o preparo de extrato. Exsicatas, para a identificação da espécie, foram

coletadas e depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA, com sob a referência INPA nº 268216.

2.1.2 Obtenção da solução extrativa e extrato seco

O preparo da solução extrativa foi realizado de forma similar ao preparado por moradores de uma comunidade rural em Santarém – Pará, que utilizam a espécie na forma de chá por decocção para tratar acidentes com serpentes (MOURA et al., 2015). Para isto, o material vegetal de *Bellucia dichotoma* foi submetido à secagem em estufa, moagem e aquecimento. Foram adicionados 50 gramas de pó da casca à água destilada na proporção de 1:10 (m:v), e submetido a agitação constante de 1.250 rpm em placa aquecedora até a fervura. O material obtido foi filtrado, liofilizado e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração. O rendimento do material liofilizado foi de 7,56% em relação à planta seca. Este estudo segue as resoluções do CGEN nº 35/11, com autorização do acesso ao Conhecimento Tradicional Associado para fins de pesquisa científica sob o número de referência 01450.008934/2014-68 SisGen.

2.2 Obtenção do veneno de *Bothrops atrox* e do soro antitoxico

O veneno de *Bothrops atrox*, extraído de serpentes adultas, provenientes da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada no Km 83 da BR-163, Santarém/Pará – Brasil, foi cedido pelo professor MSc. Hipócrates Chalkidis, do Laboratório de Pesquisa Zoológica (LPZ)/ Faculdades Integradas do Tapajós. A coleta de serpentes e a extração do veneno foram aprovadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - no 14018) e com autorização do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) ref. nº 26/2013. A peçonha, obtida *in natura*, foi liofilizada no laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, da Universidade Federal do Oeste do Pará, e após o processo de liofilização, foi produzido um “pool” do veneno e mantido a -20° C até o momento do uso. O antiveneno padrão utilizado foi o soro antitoxico produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, a partir de plasma de cavalos imunizados com a mistura dos seguintes venenos: *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops neuwiedi* (12,5%), *Bothrops alternatus* (12,5%), *Bothrops moojeni* (12,5%) e *Bothrops jararacuçu* (12,5%).

2.3 Animais

Os animais utilizados foram ratos *Wistar* para o ensaio de toxicidade aguda e camundongos *Swiss* para ensaio de edema-de-pata. Os mesmos foram mantidos nas condições de temperatura a $22 \pm 1^\circ \text{C}$, em ciclo de 12 h claro/12 h escuro, em gaiolas-padrão, com água e ração a vontade. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes da Lei Federal 11.794 de 08/10/2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais e com aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais.

2.4 Ensaio de Toxicidade Aguda do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*

Para a avaliação da toxicidade aguda oral do extrato seco de *Bellucia dichotoma*, os ratos *Wistar* foram separados em 3 grupos: grupo controle (n= 4♀) H₂O destilada 1mL/Kg (veículo), grupo 1(n= 8♀) extrato liofilizado de *B. dichotoma* 1000 mg/Kg, e grupo 2 (n= 8♀) extrato liofilizado de *B. dichotoma* 2000 mg/Kg. Após a administração, durante as primeiras 24 horas (nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas) e diariamente durante 14 dias, os animais foram observados quanto a sinais tóxicos de caráter geral: agitação, irritabilidade, depressão, resposta ao toque, aperto de cauda, contorções abdominais, força de agarrar, tremores, convulsões, hipnose, alteração na locomoção, na frequência respiratória, piloereção, sialorreia, ptose palpebral, alteração no tônus muscular, diarreia, constipação, alteração nos pelos, pele e mucosas e também o número de mortos (ANVISA, 2013). A partir da 24^a hora até 14 dias após a administração dos tratamentos, os animais foram monitorados diariamente em relação a variação de peso e o consumo de alimentos. Ao fim do período de observação, foi contabilizado o número de mortos para cálculo da DL₅₀ (Dose Letal capaz de matar 50% dos indivíduos). Após eutanásia, foram coletados sangue dos animais e avaliados quanto a alterações hematológicas. A análise hematológica foi realizada utilizando um analisador hematológico automático (Coulter STKS, Beckman). Os parâmetros analisados foram: contagem total de glóbulos vermelhos (RBC), diferencial de glóbulos brancos (WBC), hemoglobina, hematócrito, plaquetas e índices hematimétricos: coeficiente de variação de distribuição de hemácias (RDW), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM).

2.5 Desenvolvimento da forma farmacêutica sólida granulado efervescente base de *Bellucia dichotoma*

2.5.1 Ensaio pré-formulação

2.5.1.1 Determinação do pH da solução extrativa

O pH da solução extrativa foi determinado em pHmetro de bancada (Bel Engineering PHS3BW) calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0.

2.5.1.2 Análise térmica

Foi realizado a caracterização do extrato seco de *Bellucia dichotoma* através da Termogravimetria (TG) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). As análises foram realizadas por meio de termobalança, modelo TGA Q60, da marca Shimadzu®, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, sendo a massa da amostra de cerca de 3 mg (± 0.4) de extrato seco de *Bellucia dichotoma*, acondicionadas em cadinho de alumina, na faixa de temperatura de 25-600°C, na razão de aquecimento de 10°C/min. Oxalato de cálcio foi utilizado para calibrar a escala de temperatura e a perda de massa, conforme norma ASTM E1582-93 (The American Society for Testing and Materials) (ARAÚJO et al., 2006; STORPIRTS et al., 2009, KLANCNIK et al., 2010).

As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura entre 27 e 300°C, em célula calorimétrica modelo DSC 60 da marca Shimadzu®, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e utilizando cápsulas de alumínio parcialmente fechadas contendo aproximadamente 2 mg de amostra. A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura, utilizando padrões de índio (T_{fusão} = 156,6°C) e zinco (T_{fusão} = 419,5°C) metálicos com pureza de 99,99%.

2.5.2 Desenvolvimento tecnológico para a forma farmacêutica sólida granulado efervescente

No desenvolvimento tecnológico para formulação, foram utilizados como matérias-primas: o extrato seco de *Bellucia dichotoma*, como insumo ativo, o polivinilpirrolidona (PVP K30), como aglutinante, o ácido cítrico, o ácido tartárico e o bicarbonato de sódio, como promotores de efervescência, e álcool etílico a 70% como co-solvente.

Primeiramente, foi realizado um planejamento quali-quantitativo da formulação, a fim de encontrar a melhor formulação, como demonstrado na Tabela 1. Foram manipulados lotes de bancada (LB) com peso médio de 4,0 g cada lote.

Tabela 1: Porcentagem de extrato aquoso seco de *Bellucia dichotoma* e dos excipientes utilizados na formulação de granulado efervescente relativas aos Lotes de Bancada (I a IV)

Componentes	LBI (%)	LBII (%)	LBIII(%)	LBIV(%)
Extrato seco de <i>Bellucia dichotoma</i>	7,25	7,25	7,25	7,25
Ácido cítrico	16,8	13,33	14	14
Ácido Tartárico	26,8	26,67	24	24
Bicarbonato de sódio	32,15	30	38	38
Sacarina	16	16	9,75	9,75
PVP K30	1	6,75	7	7
Álcool etílico a 70%	q.s	q.s	q.s	q.s
TOTAL	100	100	100	100

O granulado efervescente foi obtido pelo processo de granulação por via úmida, iniciando-se pela pesagem dos insumos, seguido da mistura do ácido cítrico, ácido tartárico, bicarbonato de sódio, sacarina e extrato seco de *Bellucia dichotoma*. O PVP K30 foi disperso em álcool etílico a 70% e vertido sob a mistura de pós, contendo o insumo ativo e a base efervescente, realizando assim a etapa de molhagem. A massa úmida foi submetida a etapa de tamisação utilizando-se tamiz com malha de 2000 μm . O granulado foi submetido a secagem em estufa com fluxo de ar circulante, à temperatura entre $45 \pm 5^\circ\text{C}$, durante aproximadamente 40 min, até a completa secagem, e, em seguida, calibrado utilizando um tamis de malha de 1000 μm . Nos lotes de bancada LBI, LBII e LBIII, procedeu-se a etapa de molhagem por malaxagem, no entanto observou-se dificuldade na etapa de granulação. Para obtenção do LBIV, a etapa de molhagem foi realizada por asperção. Após a calibração a forma farmacêutica obtida foi acondicionada em pote plástico com dessecante. Entre os granulados obtidos, foi selecionado o lote que apresentou melhor desempenho de efervescência e solubilidade. Foi obtido ainda, um placebo com os mesmos constituintes e utilizando-se o mesmo processo de produção do lote de bancada de escolha.

2.5.3 Caracterização físico-química da formulação

2.5.3.1 Avaliação das características organolépticas

As formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto à aparência, cor e odor.

2.5.3.2 Avaliação de pH

Para determinação do pH, 4 gramas do granulado foi efervescido em 60 mL de água e analisado em pHmetro (HI 3220 Bench Meter), à temperatura ambiente, em triplicata.

2.5.3.3 Determinação da umidade

Para determinação da umidade do granulado foi utilizado o analisador de umidade da marca GEHAKA (IV3100). Amostras de 1 grama do granulado foram colocadas no equipamento o qual foram submetidas a infravermelho em temperatura ambiente por 1 minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6 Atividade bloqueadora da ação edematogênica do granulado efervescente à base de *Bellucia dichotoma*

2.6.1 Seleção dos animais

Os animais utilizados foram camundongos *Swiss*, fêmeas, pesando entre 34 a 41g. Os mesmos foram mantidos em jejum de sólidos por 12 horas antes o tratamentos. Para a realização do ensaio, os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos com n=4 para Dose mínima edematogênica e n=6 para ensaio antiedematogênico.

2.6.2 Ensaio de atividade antiedematogênica

Para avaliar a atividade antiedematogênica foi determinado inicialmente a dose edematogênica mínima do veneno de *Bothrops atrox*. Para isso, injeções subcutâneas de 50 µL de diferentes concentrações de veneno (1; 3,0; 4,5 e 6,0 µg / animal) foram administradas no coxim plantar da pata direita dos animais (YAMAKAWA et al., 1976). Um volume semelhante de solução salina estéril (controle) foi injetado na pata contralateral. O volume de cada uma das duas patas foi medido até a articulação túbio-tarsal com um pletismômetro digital (EFF 304, Plethysmometer Paw, Insight Equipamentos Científicos) antes da administração do veneno e controle salina (tempo zero) e 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 24 h após administração. O edema da pata foi expresso como diferença de volume (mL) entre a pata direita (com veneno) e a pata esquerda (salina) e o efeito antiedematogênico expresso como a

redução percentual do valor controle no tempo zero e nos pontos subsequentes (FERREIRA, 1979).

A partir da Dose Mínima Edematogênica (DME), foram realizadas injeções subcutâneas de veneno de *Bothrops atrox*, duas vezes a DME, no coxim plantar da pata direita dos animais para indução do edema. Para avaliar o potencial antiedematogênico da forma farmacêutica frente ao veneno de *B. atrox*, foram utilizados os seguintes grupos de tratamentos: (1) veneno de *B. atrox* (2 x DME, via subcutânea) e água destilada via oral; (2) granulado via oral após a injeção do veneno na dose 146 µg/mL; (3) granulado via oral após a injeção do veneno na dose 146 µg/mL + SAB por plexo venoso oftálmico; (4) granulado via oral após a injeção do veneno na dose e 283 µg/mL; (5) granulado via oral após a injeção do veneno na dose e 283µg/mL + SAB; (6) granulado via oral após a injeção do veneno na dose 566 µg/mL; (7) granulado via oral após a injeção do veneno na dose 566 µg/mL + SAB; (8) Padrão ouro: Soro Antibotrópico (SAB) via plexo venoso oftálmico (100 µL), após injeção do veneno; (9) placebo via oral após injeção do veneno. A pata esquerda contralateral de cada animal recebeu igual volume de solução salina estéril (controle negativo). O volume de cada uma das duas patas foi medido até a articulação tíbio-tarsal com um pletismômetro digital (EFF 304, Plethysmometer Paw, Insight Equipamentos Científicos) antes da administração do veneno e controle salina (tempo zero) e 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 24 h posteriores à administração. Antes de serem eutanasiados, os animais foram observados por um período de 72 horas, a fim de observar quaisquer sinais de toxicidade. O edema da pata foi expresso como diferença de volume (mL) entre a pata direita (com veneno) e a pata esquerda (salina) e o efeito antiedematogênico expresso como a redução percentual do valor controle no tempo zero e nos pontos subsequentes.

2.7 Análise Estatística

Utilizou-se Análise de Variância com um fator ou dois fatores (ANOVA One-Way ou Two-Way), de acordo com o delineamento experimental, utilizando-se o teste de Tukey para comparação pós-teste. A correção de Bonferroni foi aplicada para correção de comparações múltiplas. Os dados foram expressos como média e desvio padrão, nível de significância adotado de 5%. Os gráficos foram gerados utilizando-se o software GraphPad Prisma.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da toxicidade aguda

O extrato seco de *Bellucia dichotoma* nas doses de 1000 mg/kg (Grupo 1) e 2000 mg/kg (Grupo 2) administrado por via oral em ratos, fêmeas, *Wistar* não induziu morte em nenhum dos animais por um período de 14 dias de observação. Não foram observadas alterações no comportamento dos animais (Figura 1), na massa corporal dos animais (Figura 2), consumo de água e consumo de ração, quando comparados com o grupo controle. Não foi registrada a presença de sinais clínicos de toxicidade no comportamento animal. Os perfis hematológicos dos grupos controles e tratados estão expressos na tabela 2, na qual observa-se que não houve diferenças nos parâmetros analisados ($p < 0,05$).

Figura 1: Medição diária de tônus muscular de ratos fêmeas *Wistar* para avaliação de toxicidade do extrato de *Bellucia dichotoma*.



Figura 2: Média de peso diário de ratos fêmeas *Wistar* para avaliação de toxicidade do extrato de *Bellucia dichotoma*. Onde: Grupo I, animais tratados com dose de 1000 mg/Kg; Grupo 2, animais tratados com dose de 2000 mg/Kg; e Grupo controle, animais que receberam apenas água.

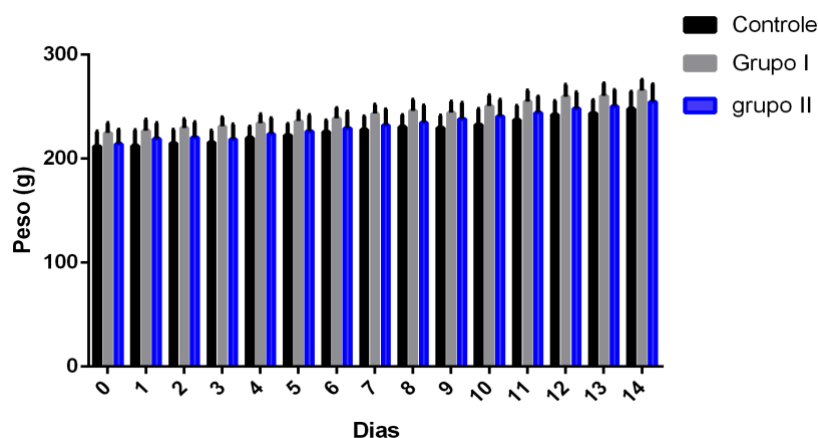


Tabela 2: Efeito do extrato de cascas de *Bellucia dichotoma* Cogn. nos parâmetros hematológicos de ratos *Wistar* fêmeas tratados para toxicidade aguda. Onde: Grupo I, animais tratados com dose de 1000 mg/Kg; Grupo 2, animais tratados com dose de 2000 mg/Kg; e Grupo controle, animais que receberam apenas água.

Parâmetros	Controle	1000mg/kg	2000mg/kg
Leucócitos (mm ³)	3800± 1137,2	2788± 1092,1	3112± 1024,6
Hemácias (mil/mm ³)	7± 0,29	7± 0,5	6,75± 0,2
Hemoglobina (g/dl)	14,3± 0,50	14± 0,7	14,25± 0,7
Hematócrito (%)	40,43± 2,08	40± 2,7	40± 1,2
Plaquetas (mil/mm ³)	958750± 124839,6	1013375± 125115,9	957750± 126905,8
RDW (%)	13± 0,42	13± 0,6	13,01± 0,3
VCM (µm ³)	58± 1,13	59± 1,2	59,28± 0,7
HCM (pg)	21± 0,47	21± 0,8	20,74± 0,3
CHCM (g/dl)	35± 0,92	36± 1,5	35,01± 0,4

Os resultados indicam que a administração do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* por via oral com doses até 2000mg/Kg não produziu sinais de toxicidade ou morte em ratos, sugerindo uma Dose Letal (DL₅₀) maior que 2000 mg/Kg, sendo desta forma considerada não-tóxica por via oral. No presente estudo não foram observados redução no peso corporal dos animais, o que sugere o extrato de *B. dichotoma*, nas doses administradas não exerceu nenhum efeito negativo sobre o crescimento, além do aumento do peso observado no decorrer do período de experimento mostrar que o extrato não prejudicou o consumo de ração. A variação no peso corporal é um indicador de efeitos tóxicos de produtos químicos (NANDY; DATTA, 2012). Além disso, os parâmetros hematológicos analisados mostraram que o extrato de *B. dichotoma* não causou alterações significativas nos índices hematológicos quando comparado ao grupo controle, sugerindo dessa forma, um efeito atóxico ao sistema sanguíneo. Os índices hematológicos são comumente utilizados como marcadores de toxicidade, tendo em vista a susceptibilidade do sistema hematopoético a compostos tóxicos, especialmente a medula óssea, local onde são produzidos os glóbulos vermelhos (ARIKA et al., 2016). Como são raros estudos avaliando a toxicidade de espécies do gênero *Bellucia* por ensaios *in vivo*, esse trabalho pode contribuir com informações sobre o gênero e a espécie *B. dichotoma* para sua utilização de forma segura.

3.2 Análise pré-formulação

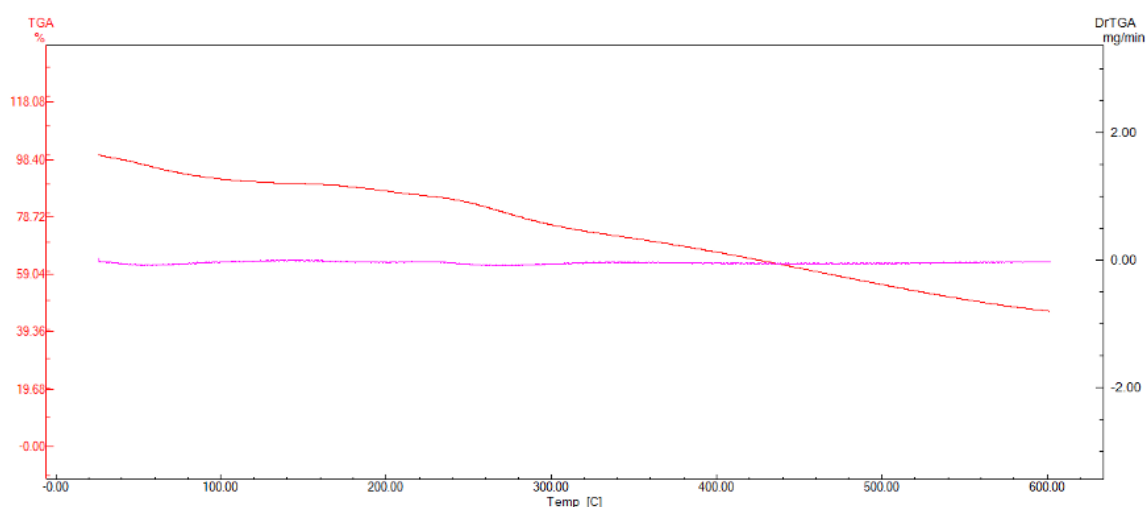
3.2.1 Caracterização da solução extrativa

O valor do pH da solução extrativa de *Bellucia dichotoma* foi 4,10. A determinação do pH foi realizada para avaliar possíveis interferências na qualidade do extrato, uma vez que esse análise fornece indicativos gerais sobre a natureza química dos compostos presentes na solução extrativa, e mudanças nos valores obtidos podem indicar alterações na estabilidade da amostra.

3.2.2 Análise Térmica do extrato seco de *Bellucia dichotoma*

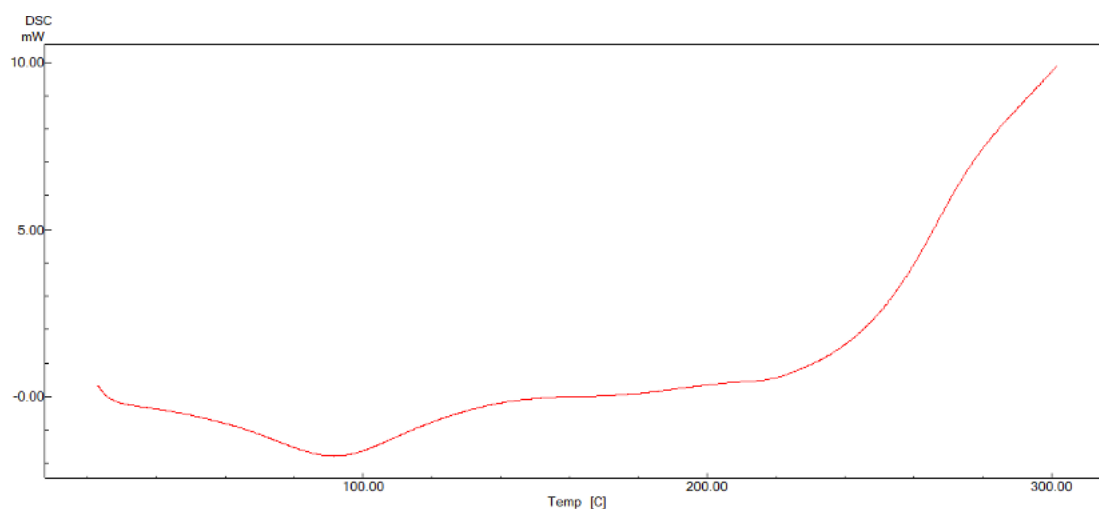
As figuras 3 e 4 mostram as curvas de Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), respectivamente, do extrato seco, por liofilização, de *Bellucia dichotoma*. Os eventos térmicos evidenciados correspondem às perdas de massa indicadas nas curvas TG e estão de acordo com aqueles apresentados na curva DSC.

Figura 3: Curva de Termogravimetria do extrato de *Bellucia dichotoma* obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.



A curva TG (Figura 3) mostra dois eventos de perda de massa nas seguintes faixas de temperatura e percentuais de perda: 25-105°C ($\Delta m = 4,68\%$); 239- 318°C ($\Delta m = 19,06\%$). A curva DSC, observada na Figura 4 corrobora com os resultados obtidos na TG, mostrando dois eventos com variação de entalpia sendo o primeiro endotérmico (desidratação) e o segundo, também endotérmico (decomposição). O que demonstra a estabilidade térmica da amostra.

Figura 4: Curva de Calorimetria Diferencial Exploratória do extrato de *Bellucia dichotoma* obtida na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando fluxo de nitrogênio de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.



De maneira geral, a liberação de umidade ou de água superficial é evidenciada nas curvas TG como uma perda de massa gradativa que ocorre desde a temperatura ambiente até próximo a 100°C (STORPIRTIS et al., 2009). Os eventos encontrados na curva TG pode ser relacionado a menor quantidade de água contida no extrato seco. Os resultados encontrados são fundamentais para o controle de temperatura durante o processo de produção de formas farmacêuticas sólidas e armazenamentos do material vegetal.

3.3 Caracterização físico-química das formulações

As formulações obtidas foram inicialmente avaliadas quanto ao grau de efervescência e solubilidade da amostra. Nesse sentido, o LBIV apresentou um bom grau de efervescência, solubilizando a amostra de forma homogênea em 60 mL de água destilada, sem formação de grumos. Dessa forma, o LBIV e placebo, formulação sem princípio ativo de *Bellucia dichotoma*, foram avaliados em testes físico-químicos 24 h após o preparo dos granulados efervescentes. Um resumo desses resultados é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização físico-química do placebo e do granulado efervescente a base de *Bellucia dichotoma*.

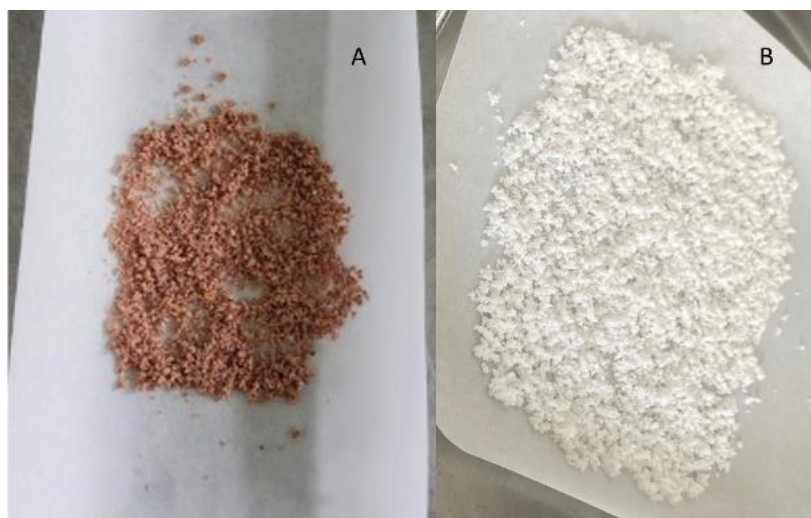
Formulação	Concentração do extrato	Odor	Cor	Aspecto	pH
Placebo	0	Sem odor	Branco	Homogêneo	4,91± 0,01
Granulado efervescente de <i>Bellucia dichotoma</i>	7,25%	Odor característico do extrato	Marrom Avermelhado	Homogêneo	5,05± 0,03

Os dados foram apresentados como média ± DP (n = 3).

Em relação as características organolépticas (Tabela 3), observou-se que o granulado placebo apresentou aspecto esbranquiçado e homogêneo, os mesmos constituintes com a adição do princípio ativo, extrato seco de *Bellucia dichotoma*, tornaram o granulado de cor marrom avermelhado, devido a coloração original do extrato. Quanto ao odor, o granulado efervescente a base de *B. dichotoma*, apresentou também um odor amadeirado, característico do extrato líquido. Os valores de pH também são apresentados na Tabela 3, e pode-se observar que a formulação não apresentou uma variação significativa do pH em relação ao placebo e da solução extrativa (pH: 4,10). Além disso, este resultado representa um dado determinante na escolha dos adjuntos empregados na formulação fitoterápica e que exerce influência na estabilidade da formulação (MACIEL; MOREIRA-CAMPOS; BRANDÃO, 2008).

A figura 5 retrata amostras do granulado placebo e do granulado à base de *Bellucia dichotoma*. Os granulados permaneceram sete dias em observação, sem alteração de cor, odor, aparência ou qualquer sinal de instabilidade. O rendimento do lote de bancada de escolha foi de 72,92%. Em relação a efervescência, ocorreu de forma esperada, sem formação de grumos. Não houve grandes mudanças de pH em relação aos lotes produzidos, mantendo-se entre 4-5.

Figura 5: Granulado efervescente de *Bellucia dichotoma* 24 horas após o preparo. Na figura o granulado a base do extrato é mostrado a esquerda (A) e o placebo a direita (B).



Em relação a umidade do granulado efervescente, o valor médio foi de 2,31%. A umidade é um fator que exerce influência na estabilidade físico-química e microbiológica da formulação fitoterápica, uma vez que valores acima do estabelecido como ideal favorecem a proliferação de fungos e bactérias, podendo ainda afetar as características reológicas das formulações, com possíveis degradações de substâncias químicas por processos de hidrólise (CHAVES; COSTA; FREITAS, 2009). O valor de umidade encontrado está dentro da faixa apontado pela Farmacopéia Brasileira (2010), que relata valor máximo de 5% para granulados, o que é de grande relevância para assegurar a qualidade da formulação obtida.

3.4 Ensaio de atividade bloqueadora da ação edematogênica

No presente estudo, a formação do edema foi observada imediatamente após a administração intraplantar da peçonha. Quando comparado a valores basais (tempo 0) o edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops atrox* em camundongos teve ação rápida, com pico de atividade 30 minutos após a injeção, seguida de lenta redução durante as 6 horas. O edema foi revertido completamente ao final de 24 h, sendo observado após esse período uma área hemorrágica no local da administração da peçonha. A atividade edematogênica foi inibida significativamente ($p < 0,05$) a partir de 30 minutos de indução do edema, onde o tratamento com fitoterápico à base de *Bellucia dichotoma* na dose 566,6 mg/kg reduziu em 58,33% em 30 minutos e 67,83% na 1ª hora de tratamento, sendo mais eficaz que o controle positivo SAB que reduziu 52,18% e 52,74%, respectivamente, no mesmo período observado.

Pode-se notar, portanto, que na primeira hora o fitoterápico reduziu com mais eficácia do que o soro o edema de pata em camundongos. Em relação ao controle negativo, água destilada, os tratamentos do fitoterápico nas doses 283,3 mg/kg e 566,6 mg/kg apresentaram diferença estatística para inibição do efeito edematogênico induzido pelo veneno de *B. atrox* (Figura 6). Não foi observado efeito sinérgico do fitoterápico, como coadjuvante, potencializando o efeito do soro (Figura 7). Os animais não apresentaram sinais de toxicidade, mantendo o consumo de água e alimentos.

Figura 6: Potencial de bloqueio de diferentes doses do fitoterápico a base de extrato de *Bellucia dichotoma* frente a atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*. Onde: controle negativo, corresponde a água destilada via oral; Placebo, os excipientes da formulação, sem extrato de *B. dichotoma*; EBd – Fitoterápico a base extrato de *Bellucia dichotoma*, três doses: 141,6 mg/kg, 283,33 mg/kg e 566,6 mg/kg; e controle positivo, SAB – Soro antibotrópico. * diferença significativa em relação ao grupo controle negativo $p < 0,05$ teste de Tukey, $n=5/$ por grupo.

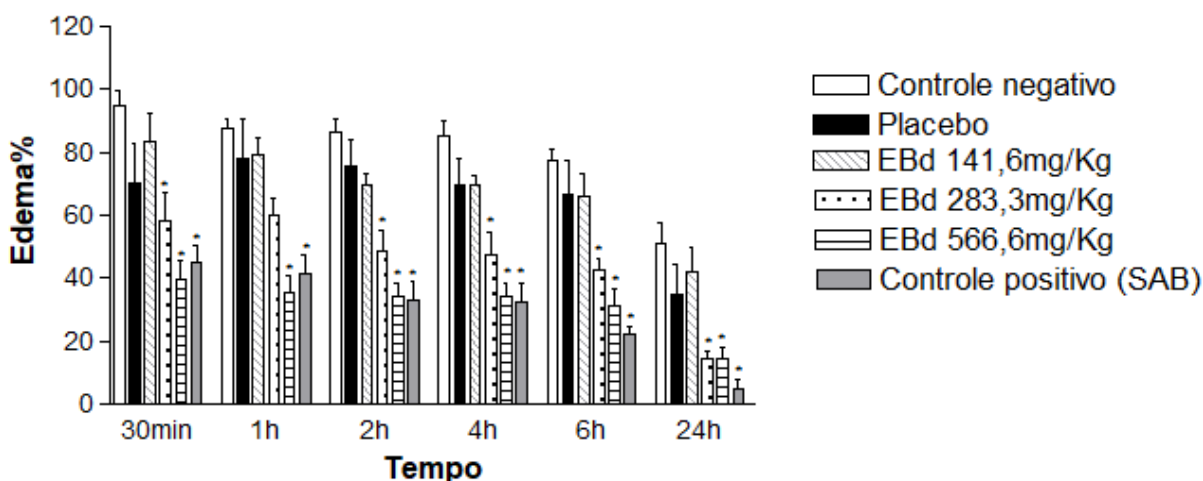
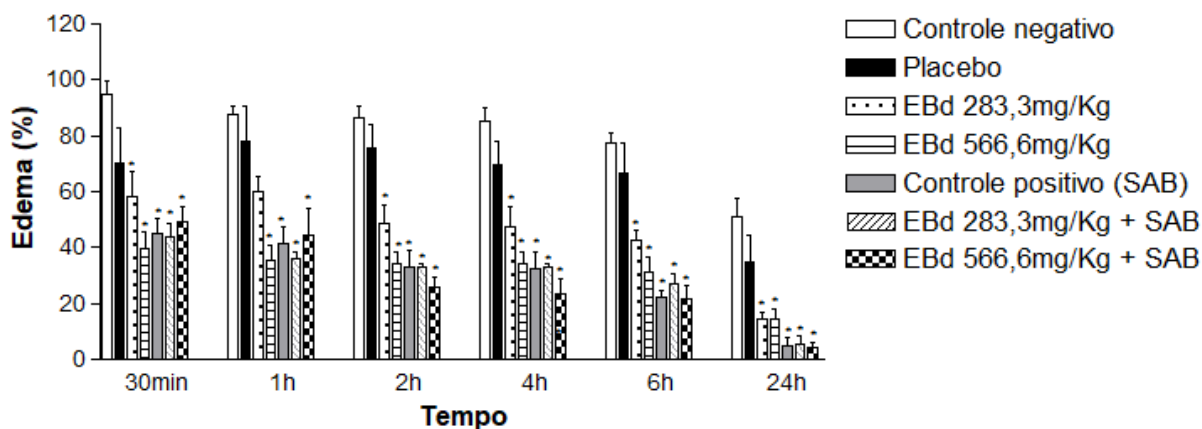


Figura 7: Potencial de bloqueio das doses 283,3 mg/kg e 566,6 mg/kg do fitoterápico a base de extrato de *Bellucia dichotoma*, com e sem Soro antibotrópico, como coadjuvante, frente a atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*. Onde: controle negativo, corresponde a água destilada via oral; Placebo, os excipientes da formulação, sem extrato de *B. dichotoma*; EBd – Fitoterápico a base extrato de *Bellucia dichotoma* nas doses: 283,33 mg/kg e 566,6 mg/kg; controle positivo, SAB – Soro antibotrópico; doses do fitoterápico de *B. dichotoma* 283,33 mg/kg com soro e 566,6 mg/kg com soro. * diferença significativa em relação ao grupo controle negativo $p < 0,05$ teste de Tukey, $n=5/$ por grupo.



As concentrações do fitoterápico que foram administrados nos animais no ensaio de edema de pata, foram definidas conforme trabalho anterior com o extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*, onde foi identificado seu potencial de bloqueio sobre a peçonha de *Bothrops atrox* em camundongos *swiss*, quando produzido em condições que simulavam o uso tradicional, na dose 283,6 mg/mL do extrato (MOURA et al., 2017). Dessa forma, o granulado efervescente foi testado nas concentrações 141,6 mg/mL, que corresponde a metade da dose do extrato bruto que apresentou os melhores resultados de bloqueio da peçonha, dose 283,6 mg/mL, correspondente a dose de melhor atividade e na concentração de 566,6 mg/mL, ou seja, duas vezes a melhor dose capaz de bloquear o edema a induzido pelo veneno. Os resultados mostraram que na primeira hora o fitoterápico foi mais eficaz que o soro antiofídico, padrão ouro, na redução do edema, com 68% de inibição, em relação ao soro com 53%.

O edema de pata induzido é uma das metodologias mais comumente utilizadas para a avaliação preliminar da atividade anti-inflamatória de uma substância, baseando-se na capacidade desta em inibir o edema produzido na pata traseira do animal modelo, por injeção de um agente edematogênico, que no presente estudo foi o veneno de *Bothrops atrox* (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). O veneno de *B. atrox* possui em sua composição proteínas e substâncias complexas que induzem a resposta inflamatória por diferentes mecanismos, ainda não completamente elucidados, e que representam um obstáculo para a abordagem terapêutica, em especial quanto aos efeitos locais observados nas vítimas (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009; MOREIRA et al., 2012). Propriedades anti-inflamatórias de espécies vegetais podem representar importantes aliados à soroterapia, uma vez que alguns estudos mostraram a pouca eficácia dos antivenenos disponíveis em bloquear os efeitos locais induzidos pelo veneno de *B. atrox*, em especial quando há demora na sua administração. O potencial antiofídico do granulado efervescente à base de *Bellucia dichotoma* observado neste estudo pode estar relacionado aos constituintes químicos presentes no extrato. Moura et al. (2017) mostraram os taninos como classe de compostos predominantes nos extratos aquosos de *B. dichotoma* coletadas em diferentes regiões. Os taninos são um grupo de compostos secundários cuja principal função é proteger as plantas contra insetos e fungos. Englobam uma vasta variedade de oligômeros e polímeros, sendo as duas principais categorias os taninos hidrolisáveis e as protocianidinas, ou taninos flavonoides condensados (SZCZUREK, 2021; RAUF et al., 2019). Essas moléculas possuem propriedades antioxidantes bem conhecidas e largamente empregadas na indústria médica para prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (CHUNG et al., 1998; LIU et al., 2017; LAI et al., 2018;

FRAGA-CORRAL et al., 2020). Além disso, possuem capacidade de complexar proteínas bem conhecida (HAGERMAN; BUTLER, 1978; COS et al., 2003). Essas propriedades associadas aos taninos podem justificar as propriedades anti-inflamatórias apresentadas pelo granulado à base de *B. dichotoma* encontrada neste estudo.

Embora a concentração empregada do extrato seco de *Bellucia dichotoma* tenha sido calculada para modelo animal murino, esses resultados contribuem para o cálculo do princípio ativo para organismos maiores, conforme a complexidade do metabolismo. O extrato não apresentou toxicidade e, portanto, concentrações maiores de *B. dichotoma* podem ser empregados para obter um granulado com doses proporcionais ao empregado pela população.

Os resultados encontrados neste estudo são promissores, tendo em vista que o acidente por *Bothrops atrox* induz edema acentuado nos acidentados, que pode evoluir para danos locais graves, inclusive com amputação ou déficit funcional do membro afetado, e que o fitoterápico à base de *Bellucia dichotoma* foi capaz de bloquear a ação do veneno. Além disso, utilizar a espécie vegetal na forma de fitoterápico é mais seguro para a população, por ser um produto que pode ser submetido a avaliação dos padrões de segurança e qualidade do princípio ativo.

Conclusões

Os resultados encontrados demonstram a potencialidade do granulado efervescente a base de *Bellucia dichotoma* como um agente antiofídico oral promissor, seguro e eficaz para o tratamento da resposta inflamatória local induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*. Além disso, a estabilidade do granulado e manutenção das atividades observadas com extrato produzido por decocção, similar a forma de preparo da população, mostram que é possível garantir a oferta de um produto prático, de fácil manipulação e que possa estar prontamente disponível para vítimas de envenenamento, reforçando a potencialidade de uma espécie vegetal da região amazônica como um agente antiofídico.

Referências Bibliográficas

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Gerência de Avaliação de Segurança e eficácia – GESEF. Brasília, 48 p., 2013.

ARAÚJO, A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando

métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 269–277, 2006.

ARIKA, W. M.; NYAMAI DW, M. M.; NGUGI, M. P.; NJAGI, E. N. Hematological Markers of *In Vivo* Toxicity. **Journal of Hematology and Thrombosis Diseases**, v. 4, p. 236–244, 2016.

BRASIL, FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5a. Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546 p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf

CHAVES, J. S.; DA COSTA, F. B.; FREITAS, L. A. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of fever few (*Tanacetum parthenium* L.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 573–584, 2009.

CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; WEI, C. I.; HUANG, Y. W, LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421–64, 1998.

COS, P.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; APERS, S.; VANDEN BERGUE, D.; VLIETINCK, A. J. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 1345–1359, 2003.

FERREIRA, S.H. A new method for measuring variations of rat paw volume. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 31, n. 1, p. 648–654, 1979.

FRAGA-CORRAL, M.; GARCIA-OLIVEIRA, P.; PEREIRA, A. G.; LOURENÇO-LOPES, C.; JIMENEZ-LOPES, C.; PRIETO, M. A.; SIMAL-GANDARA, J. Technological application of tannin-based extracts. **Molecules**, v. 25, n. 614, p. 1–27, 2020.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. **Efectos locales en el envenenamiento ofídico em América Latina**. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 33. p. 352–375.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 26, p. 809–812, 1978.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 1 ed. Plantarum, pp. 514–515, 2014.

KLANCNIK, G.; MEDVED, J.; MRVAR, P. Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation. **RMZ – Materials and Geoenvironment**, v. 57, n. 1, p. 127–142, 2010.

LAI, R.; XIAN, D.; XIONG, X.; YANG, L.; SONG, J.; ZHONG, J. Proanthocyanidins: novel treatment for psoriasis that reduces oxidative stress and modulates Th17 and Treg cells. **Redox Report**, v. 23, n. 1, p. 130–135, 2018.

LIU, H. J.; PAN, X.; LIU, B.; GUI, X.; HU, L.; JIANG, C.; HAN, Y.; FAN, Y.; TANG, Y.; LIU, W. Grape seed-derived procyanidins alleviate gout pain via NLRP3 inflammasome suppression. **Journal Neuroinflammation**, v. 14, n. 74, p. 1–10, 2017.

MACIEL, R. L.; MOREIRA-CAMPOS, L. M.; SILVA, B. C.; BRANDÃO, M. G. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica montana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16: 99–104, 2006.

MOREIRA, V.; SDOS-ANTOS, M. C.; NASCIMENTO, N. G.; DA SILVA, H. B.; FERNANDES, C. M.; LIMA, M. R.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12-20, 2012.

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

MOURA, V. M.; BEZERRA, A. N.; MOURÃO, R. H.; LAMEIRAS, J. L.; RAPOSO, J. D.; SOUSA, R. L.; BOECHAT, A. L.; OLIVEIRA, R. B.; CHALKIDIS, H. M.; DOS-SANTOS, M. C. A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. **Toxicon**, v. 85, p. 59–68, 2014.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A.; DOS-SANTOS, M. C.; RAPOSO, J. D.; LIMA, A. E.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, M. N.; MOURÃO, R. H. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 224-232, 2015.

MOURA, V. M.; SOUZA, L. Y.; GUIMARÃES, N. C.; SANTOS, I. G.; ALMEIDA, P. D.; OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H.; DOS-SANTOS, M. C. The potential of aqueous extracts of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of *Bothrops atrox* venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 196, p. 168–177, 2017.

NANDY, S.; DATTA, R. Acute and sub-acute toxicity studies of methanolic leaves extract of *Pterospermum acerifolium* (L.) Willd in rodents. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 3, n. 3, p. 1519–1529, 2012.

POHL, P.; DZIMITROWICZ, A.; JEDRYCZKO, D.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; JAMROZ, P. The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 130, p. 326–335, 2016.