



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

MARIANA ANGÉLICA OLIVEIRA BITENCOURT

**AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIPEÇONHENTA DAS ESPÉCIES *Hancornia speciosa* e
Mimosa tenuiflora EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE
INFLAMAÇÃO E ENVENENAMENTO INDUZIDOS POR
Bothrops jararaca E *Tityus serrulatus***

Natal, RN

2015

MARIANA ANGÉLICA OLIVEIRA BITENCOURT

**AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIPEÇONHENTA DAS ESPÉCIES *Hancornia speciosa* e
Mimosa tenuiflora EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE
INFLAMAÇÃO E ENVENENAMENTO INDUZIDOS POR
Bothrops jararaca E *Tityus serrulatus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos,
como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvana Maria Zucolloto
Langassner

Natal, RN

2015

MARIANA ANGÉLICA OLIVEIRA BITENCOURT

**AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIPEÇONHENTA DAS ESPÉCIES *Hancornia speciosa* e
Mimosa tenuiflora EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE
INFLAMAÇÃO E ENVENENAMENTO INDUZIDOS POR
Bothrops jararaca E *Tityus serrulatus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa
Orientador

Prof^a. Dra. Denise Vilarinho Tambourgi
Membro externo

Prof^o. Dr. Wilmar Dias da Silva
Membro externo

Prof^a. Dra. Elaine Cristina Gavioli
Membro Interno

Prof^a. Dra. Janaína Crinspim
Membro Interno

Natal, RN

2015

Catálogo da Publicação na Fonte
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Bitencourt, Mariana Angelica Oliveira.

Avaliação anti-inflamatória e antipeçonhenta das espécies *Hancornia speciosa* e *Mimosa tenuiflora* em modelos experimentais de inflamação e envenenamento induzidos por *Bothrops jararaca* e *Tityus serrulatus* / Mariana Angelica Oliveira Bitencourt. - Natal, 2015.

150f: il.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. *Hancornia speciosa* - Tese. 2. *Mimosa tenuiflora* - Tese. 3. Plantas medicinais - Antídoto - Tese. 4. *Tityus serrulatus* - Tese. I. Pedrosa, Matheus de Freitas Fernandes. II. Título.

RN/UF/BSA01

CDU 633.88

“Consulte não a seus medos, mas as suas esperanças. Pense não sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial não usado. Preocupe-se não com o que você tentou e falhou, mas com aquilo que ainda é possível a você fazer”.

Papa João XXIII

DEDICATÓRIA

À Deus.

*Pai misericordioso, rei do impossível, minha fonte de força e fé.
Dedico essa tese primeiramente a Ti, meu Senhor e meu Deus, pois
sei que tudo em minha vida tem Seu amor e cuidado.*

“Exulta o meu coração no Senhor, nele se eleva a minha força”.

Samuel 2, 1

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Maria e Salete

Por terem sido meu porto seguro, minha fonte de inspiração.

Pelo belo exemplo de amor, por nunca desistirem de mim.

Por terem me levantado toda vez que caí, cada abraço e palavra de carinho foram meu combustível para realizar cada sonho meu.

Vocês são o motivo do meu existir, com o amor de vocês conseguirei vencer todos os desafios da vida. Sem vocês essa tese não existiria. Obrigada por ser o eterno berço onde sei que posso repousar. Esta tese é de vocês, DOUTORES em amor e dedicação!

AMO VOCÊS

À minha irmã Bárbara.

Como sempre digo: Você é "BÁRBARA",

Dedico a você este trabalho, por está sempre ao meu lado.

Por ser tão amiga e companheira, obrigada por sempre me escutar e acreditar em cada sonho meu. Sua alegria é minha alegria e suas tristezas são minhas também.

TE ADORO!

Ao meu esposo Hélio.

Pelo companheirismo de sempre, amor, carinho e amizade.

Por sonhar comigo, e por realizar cada um dos nossos sonhos.

Obrigada pelo incentivo e compreensão, por ter sempre um abraço carinhoso, pronto pra transformar uma lágrima em doces sorrisos. Meu companheiro pra toda a vida.

TE AMO!

AGRADECIMENTOS

É importante dizer que não existem palavras para expressar minha gratidão por estas e tantas outras pessoas que – por problema de espaço ou memória – não foram aqui citadas. A todas elas meu carinho e meu muito obrigada!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa, por me proporcionar orientação e apoio para meu desenvolvimento intelectual e científico; muito obrigada pela confiança, por acreditar no meu trabalho, por todos os ensinamentos, foi durante esses quatro anos que descobri minha vocação e amor pela pesquisa, só tenho que te agradecer pela oportunidade de ter realizado esse trabalho sob sua orientação.

Ao programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da UFRN, pelo suporte oferecido no desenvolvimento da pesquisa e a todos os professores que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho.

À Prof^a Dr^a Silvana Maria Zuculotto Langasner, pela coorientação e apoio na realização dos estudos fitoquímicos, tão importantes para a realização desse trabalho.

À Prof^a Dr^a Denise Tambourgi, por ter gentilmente cedido as amostras das peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Tityus serrulatus*.

À Prof^a Dr^a Keila, pela realização das análises histopatológicas.

Aos colegas da pós-graduação, que compartilhamos tantos momentos importantes, em especial minha querida Íris, eterna companheira de viagens e aventuras, tenho por vocês um grande respeito e amizade sincera.

Às minhas meninas Allanny e Manoela, vocês foram peças fundamentais no meu crescimento profissional, pois foi participando tão de perto e ajudando na orientação e desenvolvimento dos seus trabalhos que tive certeza que é isso que amo fazer, muito obrigada meninas, por toda a ajuda no trabalho e por todo o carinho. Vocês sempre serão as “minhas meninas”.

À minha querida Maíra, que de uma simples colega de trabalho, virou uma companheira de vida, muitas lágrimas e alegrias compartilhadas nesses anos. Muito obrigada pela sua amizade.

Aos colegas do TecBioFar – Letícia, Karla, Alice, Lílian, Pollyanne, Alaine, Rafael, Nayara, Izadora, Fiama, Jacira, Iaponira, Philipe, minha querida Alessandra – e todos os outros que a memória não me deixa lembrar, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho, obrigada por cada palavra de carinho, por todas as risadas durante o cafezinho na copa, deixo um pedacinho do meu coração aí com vocês.

À Dona Ana e Costa, funcionários do biotério, pela preciosa ajuda com os animais.

Aos animais que vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humanidade, o meu respeito e eterna gratidão.

Às minhas avós Elpídia e Ana, por todas as orações, vovó Elpídia, muito obrigada por cada palavra de incentivo e carinho, por ser um exemplo de força e perseverança, com a senhora aprendi a ser forte e a lutar pelos meus ideais, és doutora da vida, levarei seus ensinamentos sempre comigo.

Aos meus familiares de sangue ou coração, em especial minhas amadas tia Marli mainha Mon, agradeço todas as orações, por todo o carinho, por sempre me acolhendo com tanto amor, vocês são meu porto seguro, são companheiras de toda uma vida.

Aos meus anjos da guarda na Terra, “vovó Beíca e vovô Geninha”, me faltam palavras para descrever meu carinho e agradecimento, o que posso lhes dizer é que o meu coração transborda de amor e carinho por vocês.

Aos meus queridos Wantuilson, Simplício Janderleia e Adriana, por estarem sempre comigo, em todos os momentos importantes da minha vida, a amizade de vocês é essencial pra mim, vocês são os irmãos que meu coração escolheu.

Aos queridos Ana Rita, Anne, Jarlene, Zenáide, Dona Rita, Lúcia, Javam, Anna, Aline e tantos outros amigos, deixo meu agradecimento por fazerem parte da minha vida de uma forma tão especial.

RESUMO

Os acidentes ocasionados por animais peçonhentos, pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam, representam um sério problema de saúde pública em diversas regiões do Brasil, bem como em outros países do mundo. O uso de extratos de plantas medicinais como antídoto para casos de envenenamento é uma antiga prática utilizada, ainda hoje, em muitas comunidades que não têm acesso à soroterapia. As plantas medicinais representam uma importante fonte de obtenção de compostos bioativos capazes de auxiliar diretamente no tratamento do envenenamento ou indiretamente, suplementando a soroterapia utilizada atualmente. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito dos extratos aquosos, frações e compostos isolados das espécies *Mimosa. Tenuiflora* (jurema preta) e *Harconia speciosa* (mangaba) no processo inflamatório induzido por carragenina e as peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Tityus. serrulatus*. Os resultados demonstraram que tanto os extratos de *M. tenuiflora* quanto de *H. speciosa* foram capazes de inibir a migração celular e a produção de citocinas no modelo de peritonite induzido por carragenina e peçonha de *T. serrulatus*. No modelo de envenenamento por *B. jararaca*, os camundongos tratados com os extratos das plantas em estudo reduziram o influxo leucocitário para a cavidade peritoneal. Por último, os extratos das plantas *M. tenuiflora* e *H. speciosa* apresentaram atividade antiflogística, reduzindo a formação do edema exercendo também uma ação inibitória da migração de leucócitos e dano tecidual na inflamação local induzida pela peçonha de *B. jararaca*. Além disso, foi desenvolvida a análise fitoquímica de ambos os extratos aquosos obtidos. Nessa abordagem, foi possível identificar, por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a presença de flavonóides e saponinas ou terpenos no extrato aquoso da espécie vegetal *M. tenuiflora*. Paralelamente, por meio da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi possível identificar a presença de rutina e ácido clorogênico no extrato aquoso da planta *H. speciosa*. A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir então, que a administração dos extratos, frações e compostos isolados de *M. tenuiflora* e *H. speciosa* resultou na inibição do processo inflamatório em diversos modelos experimentais. Este estudo demonstra, pela primeira vez, o efeito das plantas *M. tenuiflora* e *H. speciosa* na inibição da inflamação causada pelas peçonhas de *B. jararaca* e *T. serrulatus*.

Palavras-chave: *Mimosa tenuiflora*, *Harconia speciosa*, *Bothrops jararaca*, *Tityus serrulatus*, inflamação.

ABSTRACT

Accidents caused by venomous animals represents a significant and serious public health problem in certain regions of Brazil, as well as in other parts of the world by the frequency with which they occur and the mortality they cause. The use of plant extracts as an antidote for poisoning cases is an ancient practice used in many communities that have no access to antivenom. Medicinal plants represent an important source of obtaining bioactive compounds able to assist directly in the treatment of poisoning or indirectly supplementing serum therapy currently used. The aim of this study was to evaluate the effect of extracts, fractions and isolated compounds from *M. tenuiflora* and *H. speciosa* in the inflammatory process induced by carrageenan and the venom of *B. jararaca* and *T. serrulatus*. The results showed that both *M. tenuiflora* and *H. speciosa* were capable of inhibiting cell migration and cytokines levels in peritonitis induced by carrageenin and venom of *T. serrulatus*. In poisoning by *B. jararaca* model, mice treated with the plants in studies decreased the leukocyte influx into the peritoneal cavity. Finally the *M. tenuiflora* and *H. speciosa* had antiphlogistic activity, reducing edema formation and exerted inhibitory action of leukocyte migration in local inflammation induced by the venom of *B. jararaca*. Through of Thin Layer Chromatography (TLC) analysis was possible identified the presence of flavonoids ,saponins and/or terpenes in aqueous extract of *M. tenuiflora*. By High Performance Liquid Chromatography analysis, it was possible to identify the presence of rutin and chlorogenic acid in aqueous extract of *H. speciosa*. We conclude that the administration of extracts, fractions and isolated compounds of *H. speciosa* and *M. tenuiflora* resulted in inhibition of the inflammatory process in different experimental models. This study demonstrates for the first time the effect of *M. tenuiflora* and *H. speciosa* in inhibition of the inflammation caused by *B. jararaca* and *T. serrulatus* venom.

Keyword: *Mimosa tenuiflora*, *Harconia speciosa*, *Bothrops jararaca*, *Tityus serrulatus*, Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidômico
Ca⁺	íon cálcio
CCD	Cromatografia de camada delgada
Cl⁻	íon cloro
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX2	Ciclooxigenase 2
ECA	Enzima conversora de angiotensina
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
i.m.	Intramuscular
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IFN-γ	Interferon gama
K⁺	íon potássio
LTB4	Leucotrieno B4
Na⁺	íon sódio
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PMN	Polimorfonuclear
PGE2	Prostaglandina E2
ROS	Espécies reativas do oxigênio
TGF-β	Fator de transformação do crescimento β
Th1	Linfócito T help 1

Th2	Linfócito T help 2
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
VBj	Peçonha de <i>Bothrops jararaca</i>
VTs	Peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <i>Hancornia speciosa</i> _____	29
Figura 2 <i>Mimosa tenuiflora</i> _____	32
Figura 3 <i>Bothrops jararaca</i> _____	36
Figura 4 <i>Tityus serrulatus</i> _____	39
Figura 5 Análise por CLAE do extrato aquoso da <i>Hancornia speciosa</i> _____	69
Figura 6 Efeito do extrato aquoso de <i>M. tenuiflora</i> em modelo de peritonite induzida por carragenina _____	71
Figura 7 Efeito da administração do extrato aquoso de <i>M. tenuiflora</i> sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1 β e TNF- α , no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina _____	72
Figura 8 Efeito do extrato aquoso de <i>H. speciosa</i> em modelo de peritonite induzida por carragenina _____	73
Figura 9 Efeito da administração do extrato aquoso de <i>H. speciosa</i> sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1 β e TNF- α , no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina _____	74
Figura 10 Efeito das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e <i>n</i> -BuOH da <i>M. tenuiflora</i> em modelo de peritonite induzida por carragenina _____	75
Figura 11 Efeito da administração das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e <i>n</i> -BuOH da <i>M. tenuiflora</i> sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1 β e TNF- α , no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina _____	76
Figura 12 Efeito das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e <i>n</i> -BuOH da <i>H. speciosa</i> em modelo de peritonite induzida por carragenina _____	77

Figura 13 Efeito da administração das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e <i>n</i> -BuOH da <i>H. speciosa</i> sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1β e TNF-α, no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina _____	78
Figura 14 Efeito do Ácido Clorogênico em modelo de peritonite induzida por carragenina _____	79
Figura 15 Efeito do Ácido Clorogênico sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1β e TNF-α, no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina _____	80
Figura 16 Efeito da Rutina em modelo de peritonite induzida por carragenina _	81
Figura 17 Efeito da administração de Rutina sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1β e TNF-α no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina _____	82
Figura 18 Avaliação do envenenamento induzido por <i>B. jararaca</i> , escolha da dose-desafio _____	83
Figura 19 Efeito do extrato aquoso de <i>M. tenuiflora</i> em modelo de envenenamento induzido por <i>B. jararaca</i> . _____	84
Figura 20 Efeito do extrato aquoso de <i>H. speciosa</i> em modelo de envenenamento induzido por <i>B. jararaca</i> _____	85
Figura 21 Efeito das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e <i>n</i> -BuOH da <i>M. tenuiflora</i> em modelo de envenenamento induzido por <i>B. jararaca</i> _____	86
Figura 22 Efeito das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e <i>n</i> -BuOH da <i>H. speciosa</i> em modelo de envenenamento induzido por <i>B. jararaca</i> . _____	87
Figura 23 Efeito do Ácido Clorogênico em modelo de envenenamento induzido por <i>B. jararaca</i> _____	88
Figura 24 Efeito da Rutina em modelo de envenenamento induzido por <i>B. jararaca</i> _____	89
Figura 25 Efeito do extrato aquoso de <i>M. tenuiflora</i> em modelo experimental de inflamação local induzido por <i>B. jararaca</i> _____	94

Figura 26 Efeito das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e <i>n</i> -BuOH da <i>M. tenuiflora</i> em modelo experimental de inflamação local induzido por peçonha de <i>B. jararaca</i> _	95
Figura 27 Efeito do extrato aquoso de <i>H. speciosa</i> em modelo experimental de inflamação local induzida por peçonha de <i>B. jararaca</i> _____	96
Figura 28 Efeito das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e <i>n</i> -BuOH da <i>H. speciosa</i> em modelo experimental de inflamação local induzida por peçonha de <i>B. jararaca</i> _____	97
Figura 29 Efeito do Ácido Clorogênico em modelo experimental de inflamação local induzida por peçonha de <i>B. jararaca</i> _____	98
Figura 30 Efeito da Rutina em modelo experimental de inflamação local induzida por peçonha de <i>B. jararaca</i> _____	99
Figura 31 Avaliação do envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> , escolha da dose-desafio _____	100
Figura 32 Avaliação da cinética do envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> , escolha do tempo-resposta _____	101
Figura 33 Efeito do extrato aquoso de <i>M. tenuiflora</i> em modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> _____	102
Figura 34 Efeito da administração do extrato aquoso de <i>M. tenuiflora</i> sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1β no modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> _____	103
Figura 35 Efeito do extrato aquoso de <i>H. speciosa</i> em modelo de envenenamento induzida por <i>T. serrulatus</i> _____	104
Figura 36 Efeito da administração do extrato aquoso de <i>H. speciosa</i> sobre os níveis de IL-12, IL-6, sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1β no modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> _____	105
Figura 37 Efeito das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e <i>n</i> -BuOH da <i>M. tenuiflora</i> em modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> . _____	106

Figura 38 Efeito da administração das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e n-BuOH de <i>M. tenuiflora</i> sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1β no modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> _____	107
Figura 39 Efeito das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e n-BuOH da <i>H. speciosa</i> em modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> _____	108
Figura 40 Efeito da administração das frações CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, e n-BuOH da <i>H. speciosa</i> sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1β no modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> _____	109
Figura 41 Efeito do Ácido Clorogênico em modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> _____	110
Figura 42 Efeito da administração do Ácido Clorogênico sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1β no modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> _____	111
Figura 43 Efeito do Rutina em modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> _____	112
Figura 44 Efeito da administração de Rutina sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1β no modelo de envenenamento induzido por <i>T. serrulatus</i> _____	113

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Plantas da flora brasileira com atividade anti-peçonhenta _____ 27
- Tabela 2 – Distribuição dos grupos em modelo de peritonite induzido por carragenina 1% (1 mg/mL), utilizando extrato e frações de *M. tenuiflora* como tratamento de escolha _____ 54
- Tabela 3– Distribuição dos grupos em modelo de peritonite induzido por carragenina 1% (1 mg/mL), utilizando extrato aquoso, frações e compostos isolados de *H. speciosa* como tratamento de escolha _____ 55
- Tabela 4– Distribuição dos grupos em modelo de peritonite induzida por peçonha de *Bothrops jararaca* _____ 56
- Tabela 5– Distribuição dos grupos em modelo de envenenamento induzido por *Bothrops jararaca* (0.3 mg/kg), utilizando extrato e frações de *M. tenuiflora* como tratamento de escolha _____ 57
- Tabela 6– Distribuição dos grupos em modelo de envenenamento induzido por *Bothrops jararaca* (0.3 mg/kg), utilizando extrato aquoso, frações e compostos isolados de *H. speciosa* como tratamento de escolha _____ 58
- Tabela 7– Distribuição dos grupos em modelo de inflamação local induzida por peçonha de *Bothrops jararaca* (0.6mg/kg), utilizando extrato e frações de *M. tenuiflora* como tratamento de escolha _____ 61
- Tabela 8 – Distribuição dos grupos em modelo de inflamação local induzida por peçonha de *Bothrops jararaca* (0.6mg/kg), utilizando extrato aquoso, frações e compostos isolados de *H. speciosa* como tratamento de escolha _____ 62
- Tabela 9 – Distribuição dos grupos em modelo de peritonite induzida por peçonha de *T. serrulatus* _____ 63
- Tabela 10 – Distribuição dos grupos em modelo de envenenamento induzido por *Tityus serrulatus* (0.8 mg/kg), utilizando extrato e frações de *M. tenuiflora* como tratamento de escolha _____ 64

Tabela 11 – Distribuição dos grupos em modelo de envenenamento induzido por *Tityus serrulatus* (0.8 mg/kg), utilizando extrato aquoso, frações e compostos isolados de *H. speciosa* como tratamento de escolha. _____ 65

Tabela 12 – Resultados da triagem fitoquímica para detecção dos metabólitos secundários encontrados nas plantas em estudo. _____ 68

Tabela 13 – Avaliação da atividade antiflogística dos extratos e frações da *M. tenuiflora* em modelo de inflamação local induzida pela peçonha de *B. jararaca* 91

Tabela 14 – Avaliação da atividade antiflogística dos extratos e frações da *H. speciosa* em modelo de inflamação local induzida pela peçonha de *B. jararaca* __ 92

Tabela 15 – Avaliação da atividade antiflogística da rutina e ácido clorogênico isolados da *H. speciosa* em modelo de inflamação local induzida pela peçonha de *B. jararaca*. _____ 93

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. PLANTAS MEDICINAIS	24
1.1.1. <i>Hancornia speciosa</i>	29
1.1.2. <i>Mimosa tenuiflora</i>	31
1.2. SERPENTES	34
1.2.1. <i>Bothrops jararaca</i>	35
1.3. ESCORPIÕES	38
1.3.1. <i>Tityus serrulatus</i>	39
1.4. INFLAMAÇÃO	42
2. JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS	47
3.1. OBJETIVO GERAL	47
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3.2.1. Caracterizar os componentes químicos da <i>H. speciosa</i>	47
3.2.2. Pesquisar os efeitos do extrato aquoso e frações da <i>Mimosa tenuiflora</i> e extrato aquoso, frações e compostos isolados da <i>Hancornia speciosa</i> em modelo de peritonite induzida por carragenina.	47
3.2.2. Pesquisar os efeitos do extrato aquoso e frações da <i>Mimosa tenuiflora</i> e extrato aquoso, frações e compostos isolados da <i>Hancornia speciosa</i> em modelo de envenenamento induzido pela peçonha de <i>B. jararaca</i>	47
3.2.3. Pesquisar os efeitos do extrato aquoso e frações da <i>Mimosa tenuiflora</i> e extrato aquoso, frações e compostos isolados da <i>Hancornia speciosa</i> em modelo de inflamação local induzida pela peçonha de <i>B. jararaca</i>	48
3.2.4. Pesquisar os efeitos do extrato aquoso e frações da <i>Mimosa tenuiflora</i> e extrato aquoso, frações e compostos isolados da <i>Hancornia speciosa</i> em modelo de envenenamento induzido pela peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. MATERIAL VEGETAL	49
4.2. PEÇONHAS E SOROS ANTIBOTRÓPICO E ANTIARACNÍDICO	49
4.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	49
4.4. FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO DA <i>M. tenuiflora</i> E DA <i>H. speciosa</i>	50
4.5. ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>M. tenuiflora</i> E <i>H. speciosa</i>	50
4.5.1. Triagem fitoquímica	50

4.5.2. Análise por CCD – Cromatografia em Camada Delgada _____	52
4.5.3. CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência _____	52
4.6 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO _____	53
4.7 MODELO DE PERITONITE INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA ____	53
4.8 AVALIAÇÃO DO ENVENENAMENTO INDUZIDO POR <i>B. jararaca</i> _____	55
4.9 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO ENVENENAMENTO INDUZIDO POR <i>Bothrops jararaca</i> _____	56
4.10 INFLAMAÇÃO LOCAL INDUZIDA PELA PEÇONHA DE <i>Bothrops jararaca</i> ____	58
4.11 DETERMINAÇÃO DO EDEMA _____	59
4.12 QUANTIFICAÇÃO DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO MÚSCULO _____	60
4.13 AVALIAÇÃO DO ENVENENAMENTO INDUZIDO POR <i>T. serrulatus</i> _____	62
4.14 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR PEÇONHA DE <i>Tityus serrulatus</i> _____	63
4.15 DOSAGEM DE CITOCINAS _____	65
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	66
5. RESULTADOS _____	67
5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA _____	67
5.2 Análise do extrato da <i>H. speciosa</i> por CLAE _____	68
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DA <i>Mimosa tenuiflora</i> E EXTRATO AQUOSO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>Hancornia speciosa</i> EM MODELO DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA _____	70
5.4 AVALIAÇÃO DO ENVENENAMENTO INDUZIDO POR <i>B. jararaca</i> _____	82
5.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DA <i>Mimosa tenuiflora</i> E EXTRATO AQUOSO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>Hancornia speciosa</i> EM MODELO DE ENVENENAMENTO INDUZIDO POR <i>B. jararaca</i> _____	83
5.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DA <i>Mimosa tenuiflora</i> E EXTRATO AQUOSO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>Hancornia speciosa</i> EM MODELO DE INFLAMAÇÃO LOCAL INDUZIDO PELA PEÇONHA DE <i>B. jararaca</i> _____	90
5.7 AVALIAÇÃO DO ENVENENAMENTO INDUZIDO POR <i>T. serrulatus</i> _____	99
5.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DA <i>Mimosa tenuiflora</i> E EXTRATO AQUOSO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>Hancornia speciosa</i> EM MODELO DE ENVENENAMENTO INDUZIDO POR <i>Tityus serrulatus</i> _____	101
6. DISCUSSÃO _____	114
7. CONCLUSÃO _____	125

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
9. ANEXOS	145

1. INTRODUÇÃO

1.1. PLANTAS MEDICINAIS

A relação homem/natureza parece existir desde os primórdios da humanidade, sendo que os primeiros documentos que mostram essa relação datam da Era Paleolítica. O uso de produtos naturais, principalmente aqueles de origem vegetal, é uma forma tradicional de promover a cura ou o alívio de doenças, sendo utilizado há mais de cinco milênios em diversas civilizações (SAKLANI; KUTTY, 2008; CALIXTO, 2005).

A utilização de plantas tidas como “medicinais” é uma prática comum na medicina popular brasileira e está fundamentada no acúmulo de conhecimentos empíricos, coletados por diversos grupos étnicos, acerca da ação de espécies vegetais (FERREIRA, 2005). As pesquisas envolvendo plantas com ação curativa são complexas e apresentam um caráter multidisciplinar, principalmente quando objetivam encontrar substâncias ativas úteis na terapêutica. Nessas pesquisas, a seleção da espécie a ser estudada deve levar em consideração a indicação popular de uso medicinal – em conjunto com uma equipe que tenha experiência na identificação de espécies botânicas, no isolamento e determinação das substâncias ativas e na escolha e execução dos ensaios farmacológicos (FERREIRA, 2005). Além das informações etnobotânicas, outro grande incentivo à pesquisa com plantas é o fato de que, apesar do grande número de compostos sintéticos utilizados na terapêutica, a fitoterapia tradicional é ainda bastante utilizada, principalmente nas muitas áreas rurais de países em desenvolvimento, nas quais os conhecimentos vão sendo passados de geração a geração (CASTRO, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem chamado a atenção para a importância da medicina tradicional, já que, aproximadamente, de 65 a 80% da população mundial vive em condições de pobreza e não tem acesso à medicina moderna, dependendo somente de praticantes da medicina popular e do uso de plantas medicinais como atenção primária à saúde (GOLENIOWSKI et al., 2006; PHILLIPSON, 2007). Atualmente, até mesmo em países desenvolvidos, a população está preferindo terapias alternativas às modernas, obviamente na busca da diminuição dos efeitos colaterais causados pela maioria dos fármacos sintéticos utilizados pelas indústrias hoje (KUMAR, 2007).

Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu emprego medicinal, e ainda, na maioria desses casos, sem grande aprofundamento no que diz respeito aos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Esses dados mostram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (FOGLIO et al., 2006). Uma das formas de utilização das plantas medicinais constitui o medicamento fitoterápico, que segundo a RDC nº26/14 (BRASIL, 2014) é produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal.

Dentro desse cenário, o Nordeste brasileiro, que apresenta uma grande diversidade na sua flora, vem despertando o interesse dos governos em explorar o potencial econômico das espécies nativas. Muitas dessas espécies estão descritas em levantamentos etnobotânicos e etnofarmacológicos, que abordam sua utilização de forma eficiente – fato que contribui para a valorização desses recursos. Difundir seu uso entre as populações rurais e urbanas e reforçar a conservação dessa biodiversidade para que seja mais bem explorada e utilizada têm sido os objetivos de vários grupos de pesquisadores (DE CARVALHO, 2007; CASTRO, 2011).

O uso de espécies nativas pode constituir uma alternativa econômica para o aproveitamento sustentável da região. Como, por exemplo, no caso da organização de cooperativas em comunidades carentes, visando exercer extrativismo vegetal como fonte de renda e de melhoramento da qualidade de vida da população; podendo, ainda, muitas dessas espécies vegetais serem utilizadas como alternativas terapêuticas para diversas doenças (DE CARVALHO, 2007; ALBUQUERQUE, 2008).

No que se refere às propriedades anti-inflamatórias, objetivo deste trabalho, estudos têm demonstrado que alguns extratos vegetais são capazes de alterar a função do sistema imunológico, com uma ampla gama de efeitos imunomoduladores – atuando, por exemplo, na regulação da secreção de citocinas, na liberação de histamina e na proliferação de linfócitos (PLAEGER, 2003; SAKLANI; KUTTY, 2008). Somado a isso, a flora do estado do Rio Grande do Norte é extremamente rica, abrigando uma grande diversidade de espécies vegetais utilizadas na medicina popular. Dentre as espécies utilizadas como medicinais, pode-se destacar *Hancornia speciosa* e *Mimosa tenuiflora*, que são plantas amplamente utilizadas pela população potiguar para o

tratamento de diversas patologias. Dentro deste contexto, fez-se necessário conduzir estudos químico-farmacológicos com essas espécies vegetais.

Há diversos estudos demonstrando que a flora brasileira possui uma ampla variedade de plantas medicinais com potencial antiofídico que podem ser utilizadas no futuro como alternativa ao tratamento tradicional, na Tabela 1 está listado alguns estudos com plantas brasileiras com potencial anti-peçonhento.

Tabela 1 – Plantas da flora brasileira com atividade anti-peçonhenta

Nome popular	Planta (família)	Serpente	Atividade antiofídica	Parte da planta	Referências
Carqueja	<i>Baccharis trimera</i>	<i>B. alternatus</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. jararacussu</i> , <i>B. neuwiedi</i> , <i>B. pirajai</i>	Anti-hemorrágica, Antiproteolítica, Antifosfolipase	Folha	BERNARD et al., 2001; JANUÁRIO et al., 2004
Pata-de-vaca	<i>Bauhinia forficata</i>	<i>B. jararacussu</i>	Anticoagulante, antifibrinogenolítica, antiedematogênica	Partes aéreas	OLIVEIRA et al., 2005
Murici-cascudo, murici-vermelho	<i>Bysonima crassa</i>	<i>B. jararaca</i>	Anti-hemorrágica	Folhas	NISHIJIMA et al., 2009
Calêndula	<i>Calendula officinalis</i>	<i>B. alternatus</i>	Antiedematogênica, anti-hemorrágica, antimiotóxica	Flor	MORS et al., 2000; MELO et al., 2003

Guaçatonga	<i>Casearia sylvestris</i>	<i>B. jararaca</i> , <i>B. pirajai</i> , <i>B. jararacussu</i>	Anti-hemorrágica, antifosfolipásica	Folha	SOARES et al., 2004; CAVALCA
		<i>B. mojeeni</i>			NTE et al., 2007; DA SILVA et al., 2008
Sambaibinha	<i>Davilla elliptica</i>	<i>B. jararaca</i>	Anti-hemorrágica	Folha	NISHIJIMA et al., 2009
Baru	<i>Dipteryx alata</i>	<i>B. jararacussu</i>	Antimiotóxica	Casca	NAZATO et al., 2010
Erva-botão	<i>Eclipta prostala</i>	<i>B. jararaca</i> , <i>B. jararacussu</i>	Antimiotóxica Anti-hemorrágica	Folha, casca	OTERO et al., 2000; NUNEZ et al., 2004
Guaco	<i>Mikania glomerata</i>	<i>B. jararaca</i> , <i>B. jararacussu</i> , <i>B. altenatus</i> , <i>B. neuwiedi</i>	Anti-hemorrágica, antiedematogênica, anticoagulante	Folha	MORS et al., 2000; MAIORANO et al., 2005
Jabuticaba do mato	<i>Mouriri pusa</i>	<i>B. jararaca</i>	Anti-hemorrágica	Folha	NISHIJIMA et al., 2009

1.1.1. *Hancornia speciosa*

A espécie *Hancornia speciosa* (figura 1), conhecida popularmente como mangabeira, é uma árvore frutífera nativa do Brasil e largamente encontrada em vários estados brasileiros, com grande dispersão natural na região Nordeste. Seu fruto, principal produto consumido, é bastante apreciado pelo seu sabor levemente ácido. Ele possui um suco leitoso tóxico, e, por isso, deve ser consumido somente depois de estar totalmente maduro, quando naturalmente cair no chão. Esse fruto é utilizado na alimentação humana, principalmente na forma de suco e sorvete, podendo também ser consumido *in natura* (DARRAULT; SCHLINDWEIN, 2005; SANTOS et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

A mangabeira é uma árvore de grande porte, podendo atingir até 15 m de altura. Possui um tronco tortuoso, com ramos lisos e avermelhados. Sua casca apresenta um látex branco. Suas folhas são opostas, simples, pecioladas; ápice abruptamente acuminado ou obtuso; base arredondada; nervura mediana impressa na face ventral e elevada na face dorsal; e suas flores são brancas e perfumadas (LORENZI, 1998).



Figura 1 – *Hancornia speciosa*. Fonte: www.man.blogspot.com

O fruto apresenta casca amarelada, com manchas ou estrias avermelhadas. Possui grande valor nutritivo. Sua polpa é macia e doce, e apresenta mais vitamina C do que o limão. Da casca, extrai-se um látex, que é matéria-prima para a produção de borracha, apesar da borracha do látex da mangabeira possuir uma qualidade inferior à da seringueira (LORENZI, 1998), existem estudos que demonstram que esse látex tem um teor de proteína menor do que o extraído da seringueira, o que sugere que aquele pode ter aplicações muito importantes, como, por exemplo, a fabricação de borracha hipoalérgica (MALMONGE et al., 2009).

Na medicina popular, *H. speciosa* é usada de várias formas: infusão das folhas para aliviar a cólica menstrual e contra sintomas da gripe; o uso da casca, que é indicado para doenças internas (como tuberculose, úlceras, doenças do fígado e baço); e do látex, que visa tratar abscessos internos. Outros usos medicinais possíveis são o combate a câimbras e a função de agente emagrecedor e hipoglicemiante (POTT; POTT, 1994; MACEDO, 2005). O látex da mangabeira e o suco leitoso do fruto são utilizados popularmente para o tratamento de doenças fúngicas, contra tuberculose e também úlceras gástricas (GUARIM NETO; MORAIS, 2003; SAMPAIO; NOGUEIRA, 2005; SANTOS et al., 2007; PEREIRA, 2015).

Alguns estudos demonstraram a eficácia da mangabeira para o tratamento de úlceras gástricas – estudos nos quais foram avaliadas a ação anti-*Helicobacter pylori* (Hp) e o efeito gastroprotetor do extrato da casca do caule. Os resultados demonstraram que esse extrato possui efetividade no combate e na cicatrização de úlceras gástricas, devido a sua capacidade de estimular a síntese de muco e de produzir efeito antissecretório. Os autores observaram também o efeito anti-Hp e a ausência de toxicidade (MORAES et al., 2008). Segundo Xu (et al., 2007), a proteção da mucosa gástrica contra ataques por agentes necrosantes se dá, principalmente, pela produção de muco. Ainda foi observado que as pró-antocianinas participam na aceleração do reparo da mucosa quando a lesão é produzida por ácido acético. Os compostos fenólicos presentes no extrato da mangabeira possuem moléculas como as do grupo catecol, que apresentam atividade antioxidante, as quais estão ligadas diretamente ao processo de citoproteção (XU et al., 2007). Serra (et al., 2005) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *H. speciosa* apresenta atividade anti-hipertensiva, por inibir a enzima conversora da angiotensina (ECA); enquanto que Ferreira (et al., 2007) demonstraram que esse mesmo extrato induz vasodilatação, por meio da ativação da via PI3K.

Em ensaio de inibição de NF- κ B induzido por TPA em células HepG2-Luc, e no ensaio de inibição da enzima cicloxigenase-2 – que avalia a ação anti-inflamatória –, as atividades anti-inflamatória e quimiopreventiva foram avaliadas e o extrato etanólico bruto das folhas de *H. speciosa*, assim como sua fração metanólica, foram ativos na quimioprevenção (ENDRINGER et al., 2006). Segundo estudo realizado por Marinho (et al., 2011), o látex extraído da mangabeira apresentou atividade anti-inflamatória, inibindo a migração celular, a produção de óxido nítrico, PGE2 e citocinas pro-inflamatórias em diversos modelos experimentais de inflamação. Outro estudo, realizado com esse mesmo látex, demonstrou a eficiência desse produto na produção de

biomembranas, devido a seu baixo teor de proteínas – o que o torna menos alergênico e mais eficiente na indução da angiogênese, auxiliando, assim, em uma cicatrização de feridas mais rápida e competente (ALMEIDA et al., 2014).

Em relação à composição química, foram descritas a presença de substâncias fenólicas, tais como catequina e ácido clorogênico, no decocto das cascas deste vegetal (ANDRADE, 2002). Ainda na fração acetato de etila da infusão das cascas da *H. speciosa*, foram isolados ácidos fenólicos, tais como: ácido gálico, ácido clorogênico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico) (RODRIGUES et al., 2006; RODRIGUES, 2007). Nas folhas, foi detectada a presença de óleos voláteis, apresentando um teor variado de monoterpenos oxigenados e, como compostos majoritários, geraniol, α -terpenol e linalol (SANTOS et al., 2006). Um estudo químico, realizado em extratos polares das folhas, resultou no isolamento do inositol L-(+)-bornesitol e na identificação do flavonóide rutina por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) (FERREIRA et al., 2007).

A presença em grande quantidade de compostos com alto teor de polimerização no infuso das cascas também foi citada, catequinas monoméricas e oligoméricas (taninos condensados e proantocianidinas) (RODRIGUES et al., 2006); epicatequina e epigallocatequina (RODRIGUES et al., 2007).

1.1.2. *Mimosa tenuiflora*

A espécie *Mimosa tenuiflora* (figura 2) é uma árvore da família *Leguminosae-Mimosoideae* e é conhecida popularmente como jurema-preta. Ela é uma planta arbustiva, encontrada em larga escala no Nordeste brasileiro, estando disseminada principalmente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (OLIVEIRA et al., 1999). Ocorre, preferencialmente, em formações secundárias de várzeas, com bom teor de umidade, solos profundos, alcalinos e de boa fertilidade, onde chega a crescer vigorosamente. Suas raízes têm uma alta capacidade de penetração nos terrenos compactos. A jurema-preta possui grande potencial como planta regeneradora de terrenos erodidos; é uma espécie indicadora de uma sucessão secundária progressiva ou de recuperação, e sua tendência, ao longo do processo, é de redução da densidade. No início da sucessão, formam matas quase puras; seus folíolos caem e se refazem continuamente, cobrindo o solo com uma tênue camada, que se decompõe, formando ligeiras camadas de húmus; ela também participa da

recuperação do teor de nitrogênio do solo – preparando, dessa forma, o solo para o aparecimento de outras plantas mais exigentes (MAIA, 2004).



Figura 2 – *Mimosa tenuiflora*. Fonte: br.oocities.com

Essa é uma planta típica das áreas semiáridas do Brasil. Apresenta de 5 a 7 m de altura e tem porte arbustivo, formando hastes de mais de 1,5 m de altura, com acúleos esparsos, eretos e bem agudos. Possui caule ereto ou levemente inclinado, com ramificação abundante, desprendendo-se em porções delgadas escamiformes e ramos castanho-avermelhados, esparsamente aculeados. Apresenta casca rugosa, fendida longitudinalmente, pouco fibrosa (OLIVEIRA et al., 1999). A madeira dessa planta apresenta textura média, grã-direita, de alta resistência mecânica e grande durabilidade natural – ela é empregada, apenas localmente, na região Nordeste, para obras externas, como moirões, estacas e pontes; também pode ser utilizada em pequenas construções, como rodas, móveis rústicos, bem como para lenha e carvão. Suas flores são apícolas. A *M. tenuiflora* é uma planta pioneiramente utilizada em reflorestamentos heterogêneos, com fins preservacionistas (LORENZI, 1998).

A jurema-preta, bem como outras espécies do gênero *Mimosa*, são utilizadas por tribos indígenas do Nordeste brasileiro para a fabricação de uma bebida alucinógena chamada de “vinho da jurema”. Esse alucinógeno era utilizado em cultos por divesas dessas tribos, como os Truká (Ilha da Assunção, em Cabrobó/PE) e os Kambiwá Ibimirim (Inajá e Floresta/PE) (GRÜNEWALD, 2002).

Na medicina popular, a casca do caule é a principal parte da planta, utilizada no tratamento de diversas enfermidades, como queimaduras e inflamações. A etnofarmacologia indica o decocto da casca do tronco para lavagem de feridas da pele e queimaduras infectadas. No Herbário Nacional do México, há citações do uso dessa

planta por grupos indígenas – sendo assinalado que “da casca desta árvore é produzido um pó que seca feridas” (GONÇALVES et al., 2005).

A literatura reporta que trabalhos realizados no México, avaliando as propriedades antimicrobianas do caule de *M. tenuiflora*, demonstraram a ação inibitória dos seus extratos aquosos e etanólicos contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos dermatófitos (LOZOYA et al., 1989; PEREIRA et al., 2009). Em estudos sobre as propriedades farmacológicas *in vitro* de vários extratos do caule de jurema-preta, o extrato do caule inibiu o crescimento de diferentes microrganismos (MECKES-LOZOYA et al., 1990; BEZERRA et al., 2009). Pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de algumas árvores nativas do Brasil (Gonçalves et al., 2005) observaram uma excepcional atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de jurema-preta sobre *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase – apresentando halos que variavam entre 12 e 33 mm.

A atividade antiespasmótica foi observada na administração do extrato da casca em ratos e cobaias, quando houve uma inibição do peristaltismo intestinal, devido ao relaxamento do tecido muscular liso do íleo. Também causou um aumento do tônus muscular das paredes do estômago. O extrato da casca do caule, em baixas doses, apresentou atividade hemolítica, causando ruptura da membrana dos eritrócitos, com conseqüente hemólise; porém, em altas concentrações, apresentou atividade hemaglutinante (SOUZA et al., 2008).

Com relação à composição química, foi identificada a presença de dois alcaloides com atividade alucinógena: a N,N-dimetiltriptamina (MECKES-LOZOYA et al., 1990). Camargo-Ricalde (2001) isolou duas chalconas: kukulkan A (2',4'-dihidroxi-3',4'-dimetoxichalcona) e kukulkan B (2',4',4'-trihidroxi-3'-metoxichalcona); três saponinas: campesterol-3-O-beta-D-glucopiranosil, stigmasterol-3-O-beta-D-glucopiranosil e beta-sitosterol-3-O-beta-D-glucopiranosil; como também identificou o lupeol (ANTON et al., 1993). Os flavonóides, classificados como Tenuiflorina A-C, foram isolados do extrato das cascas por Leon (et al., 2004).

Os envenenamentos causados por animais peçonhentos não constituem doença transmissível, porém têm sido abordados juntamente com as zoonoses, uma vez que se trata de agravo, no qual ocorre a agressão por um animal, e quadro clínico, resultante da ação de toxinas inoculadas pela picada (CHIPPAUX et al., 1998).

O controle de acidentes por animais peçonhentos no Brasil teve início no ano de 1986, sendo os acidentes ofídicos os primeiros a terem notificação obrigatória. A partir de 1988, os dados sobre escorpionismo e araneísmo também passaram a compor essa lista (CARDOSO, 1993). Em 1995, o Ministério da Saúde criou o Sistema de Informações de Agravos e Notificação (SINAN), o único sistema nacional que possui módulo específico para tratar deste tipo de agravo à saúde (CARVALHO, 1997). Desde o ano de 2009, os acidentes por animais peçonhentos estão na lista das doenças tropicais consideradas negligenciadas segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) (GUTIÉRREZ et al., 2006; JORGE, 2015).

No Rio Grande do Norte, no período de 2010 a 2014, foram notificados, pelo SINAN, 22.405 acidentes por animais peçonhentos – dos quais 68% foram por escorpiões, 8% por serpentes, 3,4% por aranhas, 8,5% por abelhas e 1% por lagartas (SINAN, 2015). Em 2014 foi notificados em torno de 151.650 acidentes (SINAN, 2015). Os acidentes ofídicos constituem um sério problema de saúde pública e social, em função de sua frequência, morbimortalidade e sequelas deixadas nas vítimas (MINTON JR, 1974; JORGE, 2015).

1.2. SERPENTES

Os acidentes ofídicos representam sério problema de saúde pública nos países tropicais, pela frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam. Existem, no mundo, aproximadamente 3000 espécies de serpentes, das quais de 10 a 14% são consideradas peçonhentas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que ocorram, mundialmente, 1.250.000 a 1.665.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com 30.000 a 40.000 mortes. A mortalidade dos acidentados varia nas diferentes regiões do mundo (PINHO; PEREIRA, 2001).

No Brasil, cerca de 25.000 casos são notificados ao ano, sendo em sua maioria causadas por serpentes do gênero *Bothrops* (Z+). Essas serpentes são conhecidas popularmente como jararacas, jararacuçu ou urutu, e são responsáveis por 90,5% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil – seguidas das serpentes do gênero *Crotalus* (cascavéis), com 7,7% dos casos, das do gênero *Lachesis* (surucucus), com 1,4%, e das *Micrurus* (“corais verdadeiras”), com 0,4% dos acidentes relatados (FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2001). Contudo, o maior número de casos fatais está

relacionado com as *Crotalus*, seguidos dos relativos às serpentes dos gêneros *Lachesis*, *Micrurus* e *Bothrops*, respectivamente (CARDOSO, 2003; JORGE, 2015).

1.2.1. *Bothrops jararaca*

Embora os acidentes bothrópicos apresentem baixo coeficiente de mortalidade (0,5/100), devido ao grande número de ocorrências, os mesmos são responsáveis por 41% das mortes ocasionadas por acidentes ofídicos registrados no país (CARDOSO, 1992; MOURA, 2015). As serpentes do gênero *Bothrops* pertencem à família *Viperidae*, que compreende cerca de 30 espécies, e estão distribuídas por todo o território nacional. São responsáveis por uma morbidade maior do que qualquer outro grupo de serpentes venenosas no Novo Mundo. As espécies mais importantes são as *Bothrops asper* (na América Central) e as *Bothrops atrox* e *Bothrops jararaca* (na América do Sul). No Brasil, as espécies de *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos notificados. Estas serpentes habitam principalmente zonas rurais e periféricas de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas, e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha). Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares, e podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzirem ruídos (BRASIL, 2001).

Com relação à distribuição geográfica da *Bothrops jararaca*, ela está amplamente distribuída no Brasil, no Paraguai e na Argentina. A área de ocorrência no Brasil estende-se do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, estando amplamente distribuída no Sudeste brasileiro (PETER; OREJAS-MIRANDA, 1970; CAMPBELL; LAMAR, 2004; MOURA, 2015).

Bothrops jararaca é uma serpente terrestre de tamanho médio. Possui em média 120 cm de comprimento, podendo chegar a 160 cm, sendo relativamente delgada. O padrão de coloração desta espécie é extremamente variável. A coloração dorsal de fundo pode ser bronze, pardo, cinza, amarelo, oliva ou próximo ao marrom (Figura 3); é usualmente escura sobre a cabeça e as porções anterior e posterior do corpo. Uma proeminente faixa escura pós-orbital estende-se de trás dos olhos até o ângulo das mandíbulas. A íris é dourada para esverdeada, com finas reticulações escuras (CAMPBELL; LAMAR, 1989). O padrão dorsal consiste em uma série de desenhos trapezoidais ou subtriangulares, onde os ápices estão sobre a linha vertebral

(CAMPBELL; LAMAR, 1989). Estes desenhos podem ser pardo-escuros, marginados por uma linha negra, ou totalmente negros (LEMA, 1994). Eles podem se apresentar opostos, um de cada lado da linha dorsal, ou justapostos. As variações destes desenhos são muitas, desde elongações, fusões, fragmentações e até, em alguns indivíduos, ausentes na região média do corpo. O ventre pode ser de um esverdeado pálido para um amarelo esbranquiçado, com manchas escuras ou não; e de um cinza alvacento ao preto, irregularmente manchado (CAMPBELL; LAMAR, 1989).



Figura 3 – *Bothrops jararaca*. Fonte: <http://pt.treknature.com>

As manifestações locais, induzidas pela picada de serpentes do gênero *Bothrops*, são caracterizadas pela dor e por alterações, como edema endurecido no local da picada – de intensidade variável e, em geral, de instalação precoce e carácter progressivo –, bolhas e necrose. Esses sintomas podem ser atribuídos, inicialmente, à ação proteolítica da peçonha e, possivelmente, decorrem da atividade de proteases, de hialuronidases e de fosfolipases, da liberação de mediadores da resposta inflamatória e da ação pró-coagulante da peçonha (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1998).

A inflamação é uma característica importante em quadros de envenenamento ofídico. Vários eventos ocorrem para reconstituir o tecido lesado, tais como vasodilatação local e aumento do fluxo sanguíneo – com aumento da permeabilidade dos capilares e com extravasamento de líquido para os espaços intersticiais; e coagulação do líquido extravasado – devido a quantidades excessivas de fibrinogênio e de outras proteínas plasmáticas, que também extravasam através dos capilares para o edema formado no local da picada. Além da formação do edema, o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório é outro evento importante. Muitas células

envolvidas na resposta inflamatória já estão presentes nos tecidos, tais como as células endoteliais, os mastócitos e as células mononucleares residentes; enquanto que outras chegam ao foco inflamatório provenientes do sangue, como é o caso de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e os mononucleares (monócitos e linfócitos) (DALE; FOREMAN, 1994; REIS, 2014; WANDERLEY, 2014).

Em modelos inflamatórios, tais como edema de pata em rato ou camundongo, é descrito que as peçonhas botrópicas causam inflamação, caracterizada pela infiltração de leucócitos, edema, extravasamento de proteínas plasmáticas – efeitos esses que são decorrentes da ação de mediadores, como aminas derivadas de mastócitos, mediadores derivados da ação das ciclooxigenases, bradicinina e mediadores quimiotáticos, dentre outros (TREBIEN; CALIXTO, 1989; CHAVES et al., 1995; FARSKY et al., 1997; ZAMUNER et al., 2001; MOURA, 2014; WANDERLEY, 2014).

As toxinas de peçonhas de serpente possuem inúmeras propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais, que atuam por diferentes mecanismos na paralisia, morte e digestão da presa (MEBS et al., 2002). Estas peçonhas são constituídas por uma complexa mistura de diversas substâncias, entretanto, cerca de 95% do seu peso seco é formado por proteínas, muitas das quais apresentam atividade enzimática (GUTIÉRREZ, 2002; CALVETE, 2007). Os componentes das peçonhas das serpentes incluem citoxinas, cardiotoxinas, lectinas, e diversas enzimas, como fosfolipases A2 (PLA2), metaloproteinases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidases, catalases, ATPases, hialuronidases e NAD nucleosidases. Cada uma destas toxinas causa severos traumas como: hemorragia, mionecrose, edema e degradam uma grande quantidade de substratos naturais como fibrinogênio e colágeno (GUTIÉRREZ et al, 2007)

As PLA2 constituem a maioria dos componentes tóxicos do veneno e exibe uma variedade de efeitos farmacológicos, por mecanismos que podem ser dependentes ou independentes de sua atividade enzimática, como neurotoxicidade, miotoxicidade, hemólise, anticoagulação, efeitos sobre as plaquetas, indução de edemas e danos teciduais (SOARES; GIGLIO, 2003; KINI, 2005). As metaloproteases são toxinas hemorrágicas que compartilham um domínio proteolítico (metaloproteásica), que contém um átomo de zinco no seu sítio ativo. Agem lesando a parede vascular e produzindo hemorragia pelo seguinte mecanismo: diretamente sobre proteínas da parede

vascular, como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009). As serinoproteases atuam catalisando a conversão direta do fibrinogênio plasmático em fibrina, sem a necessidade da participação da trombina endógena. Estas enzimas, em função da atividade catalítica, agem no sistema de coagulação sanguínea, promovendo alterações na hemostasia, o que pode contribuir para uma hemorragia local e sistêmica. Elas participam da ativação do fator V da cascata de coagulação, na fibrinogénólise, na ativação de plasminogênio e indução de agregação plaquetária (SERRANO; MAROUN, 2005).

O tratamento específico consiste na administração, o mais precocemente possível, por via endovenosa, do soro antibotrópico (BEZERRA et al., 2000). Apesar da existência do soro antiofídico, a busca por um antídoto que cure o paciente acidentado por serpente tem sido uma constante na vida do homem, seja por meio de práticas que utilizem as mais diversas substâncias, desde animal, vegetal ou mineral, até rezas ou invocações do sobrenatural. Plantas e seus extratos têm sido utilizados pela medicina popular no tratamento do ofidismo – existem também algumas serpentes peçonhentas de importância médica. Tendo em vista o número de mortes causadas pelo envenenamento ofídico, particularmente em comunidades de difícil acesso, o desenvolvimento de medicamentos de baixo custo e termoestáveis para o tratamento emergencial é extremamente importante (MISE et al., 2009).

1.3. ESCORPIÕES

Os escorpiões, como muitos artrópodes, produzem peçonhas bem adaptadas para matar ou paralisar suas presas, especialmente insetos. A purificação de componentes tóxicos do veneno bruto dos escorpiões, juntamente com a análise dos seus efeitos, são os principais interesses de diversos pesquisadores em todo o mundo (KALAPOTHAKIS, 2000).

Envenenamento escorpiônico é um problema de saúde pública e se constitui como uma ameaça real em muitas partes do mundo. Milhares de pessoas são picadas anualmente por escorpiões em várias regiões semiáridas e áridas de países em desenvolvimento (AL-SADOON; JARRAR, 2003).

1.3.1. *Tityus serrulatus*

A espécie *Tityus serrulatus* (figura 4), conhecida como escorpião amarelo, é considerada a mais venenosa da América do Sul, devido à alta toxicidade do seu veneno (TORRES et al., 2002; BUCARETCHI, 2014). Apresenta grande capacidade de adaptação à vida domiciliar urbana, invadindo e colonizando os ambientes modificados pelo homem (BÜCHERL, 1969; SPIRANDELI-CRUZ et al., 1995; LOURENÇO et al., 1996; VON EICKSTEDT et al., 1996; PUCCA, 2014). Os dados do Ministério da Saúde indicam que ocorrem cerca de 78.200 acidentes em 2014, no Brasil, (SINAN, 2015). Cerca de 50% dos acidentes são diagnosticados nos estados de Minas Gerais e São Paulo; mas tem-se registrado um aumento de notificações provenientes da Bahia, do Rio Grande do Norte, de Alagoas e do Ceará (MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS, 2001; SOARES et al., 2002; CUPO et al., 2003).



Figura 4 – *Tityus serrulatus*. Fonte: www.olharambiental.com.br

As neurotoxinas são os principais componentes da peçonha do escorpião. Constituídas por diferentes classes de peptídeos, que afetam a função normal de canais iônicos, elas alteram a permeabilidade iônica de células excitáveis através da interação específica com canais para Na^+ , K^+ , Ca^+ e Cl^- voltagem dependentes, presentes nestas células, alterando o mecanismo de ativação dos mesmos e levando a intensa despolarização e liberação massiva de neurotransmissores (ISMAIL, 1995; GORDON et al., 1998; POSSANI et al., 1999). Portanto, dependendo do neurotransmissor liberado e da fibra nervosa, os efeitos podem ser adrenérgicos ou colinérgicos. Entre os efeitos mais graves, destacam-se as alterações cardiovasculares, como miocardite e

insuficiência cardíaca congestiva, o edema pulmonar e a hipertensão arterial (ISMAIL, 1995; CUPO et al., 2003).

Os efeitos tóxicos das peçonhas variam em função de alguns fatores, como a espécie do escorpião, a dose inoculada, a capacidade e o estado fisiológico das glândulas do veneno, o peso, a idade e o estado de saúde da vítima, sua sensibilidade específica e o local da picada (ISMAIL, 1995).

A síndrome escorpiônica é complexa e apresenta sinais locais, e sintomas cardiovasculares, gastrointestinais e neuromusculares (HERING et al., 1992; CUSINATO, 2010). As manifestações no local da picada são caracterizadas por dor intensa, em todos os casos, e, às vezes, parestesia (dormência) no membro acometido. Os sintomas gerais se iniciam com vômitos, sudorese, náuseas, dor abdominal, diarreia e taquicardia, podendo evoluir para bradicardia, insuficiência cardíaca, edema agudo dos pulmões e choque, bem como sinais e sintomas neurológicos (agitação, sonolência, confusão mental, convulsões e coma) (CUPO et al., 2003).

Tendo em vista que os mediadores químicos liberados pelas toxinas escorpiônicas atuam na maioria dos sistemas do organismo, os sinais e sintomas são variados, e o quadro clínico estabelecido vai depender da predominância dos efeitos – ora da acetilcolina, ora da adrenalina e noradrenalina. No sistema nervoso autônomo, alguns dos efeitos da adrenalina são: aumento da frequência, da força e da automaticidade do coração, diminuição da motilidade do trato gastrointestinal, secreção das glândulas salivares e gliconeogênese no fígado. Já a acetilcolina causa diminuição da frequência, da força e da velocidade de condução do coração, aumento da motilidade do trato gastrintestinal, além de secreção das glândulas salivares e lacrimais (CUSINATO, 2010; RANG et al., 2003).

Com base nas manifestações clínicas, os acidentes podem ser classificados em leves, moderados e graves. Os leves apresentam somente sintomatologia local, representada por dor e, eventualmente, parestesia. Os moderados apresentam, além da dor local, sialorréia e sintomas e sinais cardio-respiratórios. Os quadros graves diferenciam-se dos moderados por apresentarem uma ou mais manifestações do tipo bradicardia sinusal, bloqueio atrioventricular total, insuficiência cardíaca congestiva, choque, edema pulmonar agudo e convulsões (AMARAL; REZENDE, 1990; OLIVEIRA, 2013). Todos estes efeitos podem ser explicados pela liberação de neurotransmissores colinérgicos (VITAL BRAZIL et al., 1973) e adrenérgicos (HAMILTON, 1977, CUSINATO, 2010), associados à estimulação das supra-renais e

subsequente liberação maciça de adrenalina. Neste quadro complexo do envenenamento escorpiônico, ainda é importante considerar possíveis interações com o sistema complemento, que é um mediador importante do processo inflamatório (MOSS et al., 1973).

A resposta inflamatória induzida pela picada do escorpião leva à liberação de mediadores inflamatórios, como cininas, ecosanóides, fator de ativação plaquetária, óxido nítrico e citocinas. As interleucinas amplificam e regulam a resposta imunológica, no intuito de debelar a ação da peçonha do escorpião; porém, essa resposta inflamatória exacerbada induz à lesão tecidual no local da picada e órgãos afetados pela peçonha, agravando, assim, o quadro clínico do paciente. Citocinas Th1 são, principalmente, pró-inflamatórias, enquanto as citocinas Th2 são principalmente anti-inflamatórias. Equilíbrio entre pró e anti-inflamatório é essencial para manter a homeostase no sistema. A desregulação da expressão dessas citocinas está relacionada à patogênese do envenenamento nos seres humanos e animais de experimentação. O equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no envenenamento determina o grau e a extensão da inflamação, que pode levar a grandes efeitos clínicos, como disfunção cardíaca, edema pulmonar e choque. São observados altos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 no envenenamento escorpiônico (PETRICEVICH, 2010; FIALHO, 2011).

O tratamento do envenenamento escorpiônico consiste na adoção de três tipos de procedimentos: tratamento sintomático, manutenção das funções vitais e soroterapia específica (AMARAL; REZENDE, 2000).

A imunoterapia, considerada o único tratamento realmente específico para o envenenamento, tem sido vista como indispensável por alguns pesquisadores e estudiosos (AMARAL; REZENDE, 2000; GHALIM et al., 2000); entretanto, há controvérsias em relação à eficácia ou não do antiveneno. Esse fato tem sido baseado em observações clínicas isoladas, influenciadas por fatores como potência do antiveneno, dosagem, via de administração, disponibilidade, tipo de fragmento de imunoglobulina utilizado para seu preparo, entre outros (ISMAIL, 1995). O problema é agravado quando se verifica que antivenenos têm tendência à absorção e distribuição lentas (ISMAIL et al., 1983; ISMAIL et al., 1998; ISMAIL; ABDELSALAM, 1998), em dissonância com a peçonha de *Tityus serrulatus*, que apresenta absorção e distribuição rápidas (ISMAIL et al., 1980, 1983, 1992; ISMAIL et al., 1990; NUNAN et al., 2004).

Apesar de a soroterapia reverter com bastante eficácia os efeitos sistêmicos do veneno no organismo da vítima, conseguindo evitar por muitas vezes o óbito, ela apresenta algumas desvantagens como uma série de efeitos colaterais na vítima (reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro), ineficiência no combate dos efeitos locais do veneno (aumentando as chances de deixar sequelas no membro atingido) e a necessidade de cuidados com a estocagem do soro e com o prazo de validade (CARDOSO et al., 2003). Além disso, existem inconvenientes para essa terapia como a indisponibilidade do soro para algumas regiões do país e sua ineficiência em neutralizar alguns efeitos tóxicos em alguns casos de envenenamento (WEN, 2003; DA SILVA et al., 2007). Considerando-se essa questão, há a necessidade de desenvolvimento de novas alternativas complementares para o tratamento de humanos envenenados, utilizando plantas nativas da região Nordeste.

1.4. INFLAMAÇÃO

A inflamação, denominada *phlogosis* pelos gregos e *inflammatio* em latim, é um dos mecanismos mais primitivos de defesa do organismo animal à invasão por microorganismos patogênicos. Os sinais cardinais da inflamação foram descritos na Era Clássica por Aulus Celsus: rubor (eritema), calor (temperatura elevada), tumor (edema) e dor. Um quinto sinal, a perda da função, foi acrescentado por Rudolf Virchow. No século XVIII, Jonh Hunter verificou a dilatação dos vasos sanguíneos e Julius Cohnhein associou a inflamação à migração de leucócitos através das paredes da microvasculatura. No final do século XIX, Eli Metchnikoff enfatizou o papel da fagocitose no processo inflamatório; enquanto a importância dos mediadores químicos foi descrita posteriormente por Thomas Lewis, em 1927 (MURPHY; WARD, 2006).

Para enfrentar a invasão por um patógeno, nosso organismo recorre a uma variedade de respostas de defesa, dentre as quais se destaca a reação inflamatória (RANG et al., 2003). Quando essas defesas faltam ou são suprimidas por outras substâncias, ocorrem as infecções oportunistas, que são causadas por organismos que geralmente não são patogênicos. Entretanto, em algumas circunstâncias o processo inflamatório envolve uma série de eventos, que podem ser desencadeados contra outros tipos de lesões – causadas, normalmente, por substâncias químicas, luz ultravioleta, calor, substâncias inócuas externas, isquemia, interações antígeno-anticorpo ou contra os próprios tecidos do corpo (distúrbios autoimunes) (RANG et al., 2003; MAHAJAN

et al., 2005). Cada tipo de estímulo provoca um padrão característico de resposta, que representa uma variação relativamente pequena do mesmo tema (GOODMAN, 2005).

A resposta inflamatória, portanto, consiste de uma intrincada, altamente regulada e coordenada ação de várias moléculas e tipos celulares. Dessa forma, um processo inflamatório devidamente regulado protege o hospedeiro de infecções e permite o remodelamento da estrutura e o restabelecimento da função dos tecidos danificados após o processo de injúria (YAN; HASSON, 2007). Isso acontece porque, após o contato inicial com o agente causador da injúria tecidual, células da imunidade inata, como os fagócitos, produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF e IL-1, que agem sobre os vasos sanguíneos mais próximos, ativando-os (LUSTER, 1998). Essa ativação vascular promove a expressão de moléculas de adesão, importantes no processo de rolamento e adesão de células sanguíneas que precisam migrar do sangue para os tecidos injuriados (LIBBY et al., 1995). As primeiras células a chegarem ao tecido são os fagócitos polimorfonucleares; em seguida aparecem os monócitos, que, nos tecidos, viram macrófagos, que, por sua vez, têm um importante papel na fagocitose e na eliminação dos antígenos fagocitados (através dos mecanismos microbicidas, inerentes a essas células) (ZARBOCK; LEY, 2008). Num período mais tardio, migram os linfócitos – células da imunidade adquirida –, que auxiliam, de modo direto ou indireto, as células da imunidade inata, num mecanismo de amplificação da resposta imune. Essas células agem em conjunto para debelar a causa desse processo inflamatório; e, uma vez que o agente causador da injúria é eliminado, o sistema volta à sua homeostasia, através da produção de substâncias anti-inflamatórias e do remodelamento tecidual – como é o caso da IL-10, TGF- β e lipoxinas (ABBAS, 2008; SERHAM et al., 2008).

Os mediadores químicos responsáveis pelos eventos inflamatórios podem se originar do plasma – em formas precursoras que devem ser ativadas – e de células. Os mesmos podem estar armazenados nos grânulos intracelulares ou serem sintetizados originalmente em resposta a estímulos. Além disso, podem atuar em um ou vários tipos celulares, possuir alvos difusos, ou até mesmo apresentar efeitos diversos, de acordo com os tipos de células e tecidos (MURPHY; WARD, 2006). Os principais mediadores envolvidos na inflamação incluem histamina, serotonina, bradicinina, metabólitos do ácido araquidônico (AA), citocinas, neuropetídeos, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre outros (RANG et al., 2003).

As citocinas são mediadores polipeptídicos liberados por células do sistema imune como produtos finais da resposta celular a diferentes mensagens recebidas em sua superfície, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias. As citocinas apresentam ação direta sobre os receptores celulares, mas também podem induzir à formação de outras citocinas, constituindo, assim, uma cascata de amplificação (ABBAS, 2008). As citocinas TNF α e IL-6 são poderosos agentes inflamatórios, liberados por macrófagos ativados, sendo também mediadores centrais da inflamação (COLEMANN, 2001) e podendo agir como inibidores da migração de leucócitos para o foco inflamatório (BENJAMIM et al., 2002). Por sua vez, as quimiocinas exercem um importante papel nos processos de quimioatração e migração das células para o foco inflamatório, sendo induzidas por citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e IL-1 β . A IL-12 é uma citocina imunoregulatória, produzida por células dendríticas, macrófagos e células B, sendo uma potente indutora de resposta imune celular mediada pelos linfócitos Th1. As células Th1, estimuladas pela IL-12, produzem IFN- α , que age sobre os macrófagos – aumentando suas funções microbicidas, potencializando a produção de óxido nítrico e auxiliando, assim, na eliminação de microrganismos (SPELLBERG; EDWARDS, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

Os acidentes causados por animais peçonhentos representam um sério problema de saúde pública em diversos países do mundo, tanto pela frequência com que ocorrem quanto pelo alto índice de mortalidade que geram. Existe uma grande diversidade de animais peçonhentos, tais como serpentes, abelhas, escorpiões, entre outros. Apesar dessa grande diversidade, o envenenamento por serpentes e escorpiões desperta um maior interesse nos estudos que visam o desenvolvimento de medicamentos para auxiliar ou mesmo substituir a soroterapia; sendo as plantas tidas como medicinais o alvo de diversos estudos que buscam a comprovação de uma possível atividade antiveneno (LOREVA et al., 2006).

No Brasil, ocorrem em torno de 151.650 acidentes ocasionados pelos mais diversos animais peçonhentos. Após o envenenamento, a peçonha induz uma intensa resposta inflamatória, com a liberação de diversos mediadores da inflamação, agravando, assim, o quadro clínico do paciente vítima de envenenamento. Dessa forma, as plantas medicinais representam uma importante fonte de obtenção de compostos bioativos capazes de auxiliar diretamente no tratamento do envenenamento ou indiretamente, suplementando a sorologia – como, por exemplo, debelando a inflamação e proporcionando uma maior sobrevida ao paciente. O uso de extratos de plantas como antídoto para o envenenamento por animais peçonhentos é uma prática antiga, utilizada em muitas comunidades que não têm acesso aos serviços especializados de assistência à saúde – ou mesmo à soroterapia em hospitais próximos. Além disso, dependendo do tempo entre o acidente e o tratamento, a eficiência do soro para neutralizar efeitos locais de envenenamento é somente parcial. Extratos vegetais, como também suas frações ou compostos isolados, constituem fontes importantes para obtenção de um suplemento alternativo para a soroterapia; podendo, futuramente, auxiliar no tratamento tradicional utilizado nos envenenamentos em humanos.

A flora brasileira apresenta uma grande diversidade de espécies vegetais, sendo algumas dessas espécies amplamente utilizadas na medicina popular – dentre as quais se destacam a *Hancornia speciosa* e a *Mimosa tenuiflora*. Devido à baixa incidência de estudos acerca do fruto da mangaba e da ação biológica das folhas e casca dessa espécie, como também à escassez de estudos acerca da atividade antiveneno e anti-inflamatória da jurema-preta, optou-se por estudar a ação de extratos e frações dessas plantas – assim como sua atividade antiveneno – em modelos de inflamação.

Experimentos piloto, realizados no nosso laboratório, demonstraram a eficácia dos extratos aquosos do fruto da *H. speciosa* e da casca da *M. tenuiflora* no modelo de inflamação de edema de orelha induzido por xilol. Os resultados prévios indicam que essas plantas têm eficácia no tratamento de inflamações, inibindo a formação do edema, que representa um sinal cardinal da inflamação. Portanto, se essas plantas demonstraram atividade antiflogística, possivelmente apresentarão a capacidade de inibir a migração celular e a produção de mediadores que desencadeiem diversas doenças de caráter inflamatório. Dessa forma, tornou-se importante dar continuidade aos trabalhos em andamento, na busca de comprovar a atividade anti-inflamatória e antiveneno de ambas as espécies vegetais – para que essas possam, assim, ser utilizadas como alternativas ou complementos da terapia antiveneno em regiões onde o acesso à soroterapia é restrito ou nulo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial anti-inflamatório e anti-peçonhento do extrato aquoso e frações da *Mimosa tenuiflora* e do extrato aquoso, frações e compostos isolados da *Hancornia speciosa* em modelos experimentais de inflamação e envenenamento por *Bothrops jararaca* e *Tityus serrulatus*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Caracterizar os componentes químicos da *H. speciosa*. A identificação e a caracterização dos componentes químicos de um extrato vegetal são de extrema importância para o entendimento do mecanismo de ação da planta, como também oferecem subsídios para o desenvolvimento de novos fármacos fitoterápicos.

3.2.2. Pesquisar os efeitos do extrato aquoso e frações da *Mimosa tenuiflora* e extrato aquoso, frações e compostos isolados da *Hancornia speciosa* em modelo de peritonite induzida por carragenina. Peritonite é uma inflamação grave, que muitas vezes leva à falência múltipla de órgãos e mortalidade (KHAN, 2004). A vantagem desse modelo consiste na quantificação precisa da migração leucocitária por meio do infiltrado celular no exudato peritoneal. Na peritonite induzida por carragenina, há uma rápida resposta inflamatória, apresentando intenso acúmulo de polimorfonucleares (PMN) e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α (RIBEIRO et al., 2014). Com isso, foi pesquisado se as plantas *M. tenuiflora* e *H. speciosa* apresentam a capacidade de inibir a migração de células para a cavidade peritoneal de camundongos inoculados com carragenina.

3.2.2. Pesquisar os efeitos do extrato aquoso e frações da *Mimosa tenuiflora* e extrato aquoso, frações e compostos isolados da *Hancornia speciosa* em modelo de envenenamento induzido pela peçonha de *B. jararaca*. A *Bothrops jararaca* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil. A peçonha dessa serpente, após o envenenamento, induz severos efeitos fisiopatológicos, caracterizados

por lesão tecidual no local da picada e intensa reação inflamatória (ZAMUNER et al., 2001). A administração intraperitoneal de VBj em camundongos induz uma rápida resposta inflamatória, caracterizada pela intensa migração leucocitária para a cavidade peritoneal. Portanto, foi avaliado o efeito das plantas *M. tenuiflora* e *H. speciosa* em modelo de peritonite induzida por VBj – um importante modelo para estudar a inflamação aguda e o processo de envenenamento pela serpente *B. jararaca*.

3.2.3. Pesquisar os efeitos do extrato aquoso e frações da *Mimosa tenuiflora* e extrato aquoso, frações e compostos isolados da *Hancornia speciosa* em modelo de inflamação local induzida pela peçonha de *B. jararaca*. A patogênese do envenenamento por *B. jararaca* é complexa, envolvendo a ação combinada de serino-proteínases, metaloproteinases e fosfolipases presentes na peçonha (ROTHSCHILD; ROTHSCCHILD, 1979; GUTIERREZ; LOMONTE, 1989). Componentes do VBj causam efeitos locais graves logo após o envenenamento, caracterizados principalmente por hemorragia local e uma reação inflamatória aguda, com um grande influxo celular (LOMONTE et al., 1993; LOMONTE, 1994; FARSKY et al., 1997; BARROS et al., 1998; PETRICEVICH et al., 2000; ZAMUNER et al., 2001). A migração leucocitária para o músculo onde ocorreu a picada é um processo que acontece em várias etapas, ocorrendo uma interação dinâmica entre as moléculas de adesão expressas pelos leucócitos e as células endoteliais (BEVILACQUA; NELSON, 1993).

3.2.4. Pesquisar os efeitos do extrato aquoso e frações da *Mimosa tenuiflora* e extrato aquoso, frações e compostos isolados da *Hancornia speciosa* em modelo de envenenamento induzido pela peçonha de *Tityus serrulatus*. O envenenamento ocasionado pela picada do escorpião *T. serrulatus* ocasiona manifestações clínicas severas, devido ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória intensa, levando a produção de citocinas proinflamatórias e catecolaminas, como também, uma intensa migração leucocitária para o local da picada (SOFER, 1996; ZEGHAL, 2000). A injeção da peçonha desse escorpião em animais de experimentação produz efeitos sistêmicos e locais, com sinais e sintomas semelhantes aos observados em envenenamento humano (FREIRE-MAIS; CAMPOS, 1989). Com isso, foi pesquisado se as plantas *M. tenuiflora* e *H. speciosa* apresentam a capacidade de inibir a migração de células para a cavidade peritoneal de camundongos inoculados com VTs.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

As amostras do fruto da *Hancornia speciosa* e cascas da *Mimosa tenuiflora* foram coletadas em região de cultivo do RN no mês de março de 2011. Após a coleta e identificação, os frutos da *H. speciosa* foram utilizados *in natura*. Esses frutos foram cortados, com o auxílio de uma faca, em pedaços menores, já as cascas da *M. tenuiflora* foram secas em local seco ao abrigo de luz, em seguida as cascas foram trituradas em moinho de facas. Foram depositadas exsicatas no Herbário Parque das Dunas do Centro de Biociências da UFRN sob os registros UFRN 16880 (*H. speciosa*) e UFRN 12563 (*M. tenuiflora*). A coleta foi realizada mediante a autorização e Informação de Biodiversidade (Sisbio nº 35017) e autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético (Processo 010844/2013-9).

4.2. PEÇONHAS E SOROS ANTIBOTRÓPICO E ANTIARACNÍDICOS

Os venenos liofilizados *B. jararaca* (VBj) e *T. serrulatus* (VTs) e os antivenenos foram fornecidos pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil. Os venenos foram preparados em solução salina fisiológica na concentração de 1 mg / mL e armazenados a -20 °C até o momento do uso.

4.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Cascas secas e moídas (*M. tenuiflora*) e frutos cortados em pedaços menores (*H. speciosa*) foram submetidos à extração sob decocção, na qual o material vegetal foi deixado em contato com água fervente por 15 minutos, com relação casca:água de 1:10 (m:v) e fruto:água de 1:10 (m:v), respectivamente. Após o período de 15 min, os extratos foram filtrados. Parte do decocto foi utilizada para as análises fitoquímicas e a outra parte foi liofilizada para uso *in vivo* e, posteriormente, para o processo de fracionamento. Para a liofilização, os extratos foram previamente congelados por 24 h, a -85 °C, e, em seguida, submetidas ao liofilizador Christ, modelo Alpha 1-2 LD. Para o processo de fracionamento, foi repetido o processo de preparação dos extratos descrito acima, e o volume dos extratos obtidos foi reduzido para 500 mL. Por fim, os extratos

foram particionados com solventes de polaridade crescente (diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol), segundo Zucolotto (2005).

4.4. FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO DA *M. tenuiflora* E DA *H. speciosa*

Para o fracionamento, o extrato aquoso foi ressuspensionado em água destilada e submetido à partição com solvente com polaridades crescentes: diclorometano (3 x 300 mL), acetato de etila (3 x 300 mL), e *n*-butanol (3 x 300 mL). As frações obtidas foram evaporadas sob pressão reduzida, obtendo-se 750 mg de diclorometano (CH₂Cl₂), 1,0 g de acetato de etila (AcOEt), e 2,5 g de *n*-butanol (*n*-BuOH), para a *M. tenuiflora*; e 750 mg da fração CH₂Cl₂, 1,0 g da fração AcOEt, e 2,5 g da fração *n*-BuOH, para a *H. speciosa*. As frações de CH₂Cl₂ (Fr 1), EtOAc (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr 3) foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Os processos de produção e purificação dos extratos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa* dotados de atividade antiveneno foram submetidos ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) para pedido de Patente de Invenção (número do depósito da patente PI033120000116, INPI).

4.5. ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *M. tenuiflora* E *H. speciosa*

Para a caracterização do extrato aquoso, foram feitas as análises: triagem fitoquímica, cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.5.1. Triagem fitoquímica

Na triagem fitoquímica, os extratos aquosos foram submetidos a diversos testes qualitativos de precipitação e coloração específicos, para as principais classes de metabólitos secundários – conforme Matos (1995), Simões e Petrovick (2003) e Zucolotto e Brandt (2001). Foram pesquisadas a presença de compostos fenólicos, flavonóides, saponinas, taninos e alcalóides.

Compostos fenólicos e flavonóides

Para a detecção de compostos fenólicos e flavonóides, foram pesados 5g das cascas de *M. tenuiflora* e frutos frescos de *H. speciosa*, e adicionados 50 mL de etanol 70%. O extrato foi aquecido, e, após atingir fervura, foi deixado sob aquecimento por 10 minutos. Posteriormente, o extrato foi filtrado e utilizado para as reações de identificação.

Em um tubo de ensaio contendo 2 mL dos extratos alcoólicos das plantas, foram adicionadas 2 gotas de solução de cloreto férrico (2.5%), para verificar a presença de compostos fenólicos. O cloreto férrico atua como agente oxidante, oxidando as hidroxilas fenólicas e resultando em substâncias coradas (Zucolotto; Brandt, 2001).

A presença de flavonóides foi analisada por meio da reação de Shinoda ou Cianidina, onde 3 mL dos extratos etanólicos foram evaporados sob uma cápsula de porcelana, em banho-maria. Em seguida, foram adicionados 0.3 mL de clorofórmio, para eliminação da clorofila. Subsequentemente, foram dissolvidos em 1 mL de etanol, a 70%. Os extratos foram transferidos para tubos de ensaio. Adicionou-se, então, 1 mL de HCl concentrado; posteriormente, foram adicionados 200 mg de magnésio em pó. A reação foi identificada através do desenvolvimento de uma coloração entre o laranja e o vermelho (ZUCOLOTTO; BRANDT, 2001).

Taninos

Foi preparado, por decocção, um extrato aquoso das cascas de *M. tenuiflora* e dos frutos frescos de *H. speciosa*. Um volume de 2 mL dos extratos foi transferido para tubos de ensaio, adicionando-se uma solução de gelatina a 2.5%. A presença de taninos foi verificada através da formação de um precipitado na presença da gelatina. A reação para detecção de taninos tem por base uma característica essencial: a precipitação de proteínas, formando complexos irreversíveis ou reversíveis (ZUCOLOTTO; BRANDT, 2001).

Saponinas

Para verificar a presença de saponinas, 2 mL dos extratos aquosos foram transferidos para tubos de ensaio – nesses, foram adicionados 4 mL de água destilada. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 1 minuto. Após a agitação, foi observado o aparecimento de espuma persistente. Nesse teste, a formação de espuma se baseia nas características físico-químicas dos taninos, que formam uma espuma

persistente devido a sua propriedade de diminuição da tensão superficial (ZUCOLOTTO; BRANDT, 2001).

Alcalóides

Por fim, temos os alcalóides, que foram detectados pelo método de precipitação. Foram pesados 2g das cascas de *M. tenuiflora* e de frutos frescos de *H. speciosa*. Foram adicionados 20 mL de ácido sulfúrico a 10%. O extrato foi aquecido e deixado sob fervura por 5 minutos. Posteriormente, foi filtrado, e 2 gotas dos extratos foram misturadas em uma placa de vidro, com os diversos reagentes: Dragendorff e Wagner. As reações positivas possibilitaram observar a formação de precipitado amarelo, branco e alaranjado (ZUCOLOTTO; BRANDT, 2001).

4.5.2. Análise por CCD – Cromatografia em Camada Delgada

Para a análise por CCD, foram utilizadas chapas de alumínio, revestidas com gel de sílica F254 (Merck). Todos os cromatogramas foram desenvolvidos em uma câmara saturada. O sistema solvente utilizado foi o seguinte: acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (8: 0.5: 0.5: 0.5 v / v / v / v). Posteriormente, as placas foram secas e as manchas visualizadas, sequencialmente, sob luz UV a 254 e 365 nm. As placas foram, em seguida, pulverizadas com os reveladores: *Vanilina Sulfúrica* (4%), revelador universal; Cloreto Férrico, para compostos fenólicos; Reagente natural A 0,1% (NP-Reagent), específico para flavonóides.

4.5.3. CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Preparação referenciada amostra e dos padrões de referência

Os padrões foram usados na concentração de 50 µg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicada.

O extrato da *H. speciosa* foi solubilizado em metanol: água (1:1) em balão volumétrico para a concentração de 5 mg/mL. O metanol utilizado foi da VETEC, e a água, Mili-Q. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm (MILEX®); e uma alíquota de 20 µL do filtrado foi injetada para análise por CLAE. Todas as análises foram realizadas em triplicada.

Análise por CLAE

A análise foi realizada num cromatógrafo ProStar Varian® 240, equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD), uma bomba quaternária e um amostrador automático. Todos os dados de CLAE foram processados utilizando o *software* Galaxie™ Chromatography. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa (Phenomenex®) C-18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm). A fase móvel foi (A) acetonitrila (B), ácido acético a 1%; utilizando o seguinte gradiente de 0-5 min 13:87% (A) em (B), 5-25 minutos, 18:82% (A) em (B), 25-30 min 20:80% (a) em (B) e de 30-35 min 21:79% (a) em (B), a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min e UV 340 nm. Para preparar a solução de ácido acético a 1% foi utilizado solvente VETEC® e água Milli-Q. A acetonitrila foi adquirida da empresa VETEC®. Todos os solventes utilizados na análise por CLAE foram filtradas em membrana de 0,45 µm (MILEX®); e a desgaseificação foi em banho de ultra-som. Os picos observados nos cromatogramas foram identificados por comparação com o tempo de retenção (*TR*) dos padrões de referência e os seus espectros de UV, e por co-injeção (padrões de referência + extrato).

4.6 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos BALB/c machos e fêmeas (25-35 g), de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério setorial do Centro de Ciências da Saúde da UFRN. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial. Os animais foram mantidos na sala de experimento durante pelo menos uma hora antes da realização dos testes, para adaptação. Todos os experimentos *in vivo* foram aprovados pelo “Comitê de Ética no Uso de Animais, CEUA/UFRN”, sob o protocolo número 008/2011, que estava de acordo com a Lei Nº 11794 2008.

4.7 MODELO DE PERITONITE INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA

Camundongos BALB/c de 6 a 8 semanas foram inoculados pela via intravenosa (i.v.) com PBS estéril, extratos aquosos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa*, nas doses de 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg; as frações CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH (20 mg/kg), rutina e ácido clorogênico (2, 2.5 e 5 mg/kg) i.v. e dexametasona (0.5 mg/kg) pela via

intraperitoneal (i.p.). Trinta minutos (30') após o tratamento com os extratos e frações de *M. tenuiflora* e *H. speciosa*, isolados rutina e ácido clorogênico, e dexametasona, os animais receberam injeção na cavidade peritoneal de 1mL de carragenina 1% (1 mg/mL), diluído em PBS estéril. Após 4 horas, os camundongos foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg), pela via intraperitoneal, e eutanasiados por deslocamento cervical; e o exsudato peritoneal foi colhido por laparoscopia, realizando a lavagem peritoneal com 3 mL de PBS gelado. Em seguida, o aspirado foi centrifugado a 250 x g' por 10 minutos, a 4 °C. O *pellet* foi ressuscitado em 0,5mL de PBS gelado. A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer, diluindo o concentrado celular em solução de *Turk* (1:10) para a contagem total de leucócitos. Os resultados foram expressos em número de leucócitos/cavidade. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem das citocinas pro-inflamatória IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α por ELISA, seguindo as recomendações do kit da eBioscience. Foram utilizados, como controles negativos, camundongos inoculados apenas com PBS, tanto pela via intraperitoneal, como pela intravenosa; e, como controles positivos, camundongos inoculados com carragenina pela via intraperitoneal e com PBS pela via intravenosa.

Tabela 2 – Distribuição dos grupos em modelo de peritonite induzido por carragenina 1% (1 mg/mL), utilizando extrato e frações de *M. tenuiflora* como tratamento de escolha.

Grupos	Tratamento	Intraperitoneal após 30'
Grupo 1	PBS i.v.	PBS
Grupo 2	PBS i.v.	Carragenina
Grupo 3	Extrato aquoso 20 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 4	Extrato aquoso 30 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 5	Extrato aquoso 40 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 6	Fração CH ₂ Cl ₂ 20 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 7	Fração AcOEt 20 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 8	Fração <i>n</i> -BuOH 20 mg/kg i.v.	Carragenina

Grupo 9	Dexametasona 0.5 mg/kg i.p.	Carragenina
----------------	-----------------------------	-------------

Tabela 3– Distribuição dos grupos em modelo de peritonite induzida por carragenina 1% (1 mg/mL), utilizando extrato aquoso, frações e compostos isolados de *H. speciosa* como tratamento de escolha.

Grupos	Tratamento	Intraperitoneal após 30'
Grupo 1	PBS i.v.	PBS
Grupo 2	PBS i.v.	Carragenina
Grupo 3	Extrato aquoso 20 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 4	Extrato aquoso 30 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 5	Extrato aquoso 40 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 6	Fração CH ₂ Cl ₂ 20 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 7	Fração AcOEt 20 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 8	Fração <i>n</i> -BuOH 20 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 9	Rutina ou ác. Clorogênico 2 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 10	Rutina ou ác. Clorogênico 2.5 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 11	Rutina ou ác. Clorogênico 5 mg/kg i.v.	Carragenina
Grupo 12	Dexametasona 0.5 mg/kg i.p.	Carragenina

4.8 AVALIAÇÃO DO ENVENENAMENTO INDUZIDO POR *B. jararaca*

Primeiramente, fez-se necessária a escolha da dose-desafio do VBJ, a qual seria utilizada nos experimentos subsequentes para a avaliação da capacidade de inibição do processo inflamatório, induzido pela peçonha de *B. jararaca*, pelos extratos de *M.*

tenuiflora e *H. speciosa*. A fim de avaliar o envenenamento induzido por VTs e estabelecer a dose-desafio da peçonha, foi utilizado o modelo experimental de peritonite: grupos de seis camundongos BALB/c machos, de 6 a 8 semanas de idade, foram injetados pela via intraperitoneal (i.p.) com 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.6 mg/kg da peçonha de *B. jararaca*, dissolvida em 100µL PBS estéril. Passados 4, 6 e 8 horas, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg i.p.) e eutanasiados por deslocamento cervical. O exsudato peritoneal foi colhido por laparoscopia, realizando-se a lavagem peritoneal com 3 mL de PBS gelado. Em seguida, o aspirado foi centrifugado a 250 x g' por 10 minutos, a 4°C. O *pellet* foi ressuspensionado em 0,5mL de PBS gelado. A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer, diluindo o concentrado celular em solução de *Turk* (1:10) para contagem total de leucócitos. Os resultados foram expressos em número de leucócitos/cavidade. Depois de selecionar a dose-desafio do VBj, foi realizado o ensaio de inibição do processo inflamatório, induzido pela peçonha de *Bothrops jararaca*, pelos extratos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa*.

Tabela 4– Distribuição dos grupos em modelo de peritonite induzida por peçonha de *Bothrops jararaca*.

Grupos	Intraperitoneal
Grupo 1	VBj 0.1 mg/kg
Grupo 2	VBj 0.2 mg/kg
Grupo 3	VBj 0.3 mg/kg
Grupo 4	VBj 0.4 mg/kg
Grupo 5	VBj 0.6 mg/kg

4.9 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO ENVENENAMENTO INDUZIDO POR *Bothrops jararaca*

O modelo experimental de envenenamento induzido pela peçonha de *B. jararaca* foi realizado de acordo com Pessini (et al., 2006), com ligeiras modificações. Para isso,

camundongos BALB/c, de 6 a 8 semanas, foram inoculados pela via intravenosa (i.v.) com PBS estéril, extratos aquosos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa*, nas doses de 10mg/kg, 15mg/kg, 20 mg/ kg; as frações CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH (20 mg/kg), rutina e ácido clorogênico (1.5, 2, 2.5mg/kg) e 100µL de soro anti-botrópico. Cinco minutos (5') após o tratamento com os extratos e frações de *M. tenuiflora* e *H. speciosa*, isolados rutina e ácido clorogênico, e soro antiofídico, os animais receberam injeção na cavidade peritoneal de 100µL de VBJ 0.6 mg/kg diluído em PBS estéril. Após 4 horas, os camundongos foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg) pela via intraperitoneal e eutanasiados por deslocamento cervical. O exsudato peritoneal foi colhido por laparoscopia, realizando a lavagem peritoneal com 3 mL de PBS gelado. Em seguida, o aspirado foi centrifugado a 250 x g' por 10 minutos, a 4°C. O *pellet* foi ressuspendido em 0,5mL de PBS gelado. A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer, diluindo o concentrado celular em solução de *Turk* (1:10) para contagem total de leucócitos. Os resultados foram expressos em número de leucócitos/cavidade.

Tabela 5– Distribuição dos grupos em modelo de envenenamento induzido por peçonha de *Bothrops jararaca* (0.3 mg/kg), utilizando extrato e frações de *M. tenuiflora* como tratamento de escolha.

Grupos	Tratamento	Intraperitoneal após 5'
Grupo 1	PBS i.v.	PBS
Grupo 2	PBS i.v.	VBj
Grupo 3	Extrato aquoso 10 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 4	Extrato aquoso 15 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 5	Extrato aquoso 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 6	Fração CH ₂ Cl ₂ 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 7	Fração AcOEt 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 8	Fração <i>n</i> -BuOH 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 9	Soro anti botrópico i.v.	VBj

Tabela 6– Distribuição dos grupos em modelo de envenenamento induzido por de *Bothrops jararaca* (0.3 mg/kg), utilizando extrato aquoso, frações e compostos isolados de *H. speciosa* como tratamento de escolha.

Grupos	Tratamento	Intraperitoneal após 5'
Grupo 1	PBS i.v.	PBS
Grupo 2	PBS i.v.	VBj
Grupo 3	Extrato aquoso 10 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 4	Extrato aquoso 15 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 5	Extrato aquoso 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 6	Fração CH ₂ Cl ₂ 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 7	Fração AcOEt 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 8	Fração <i>n</i> -BuOH 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 9	Rutina ou ác. Clorogênico 2 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 10	Rutina ou ác. Clorogênico 2.5 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 11	Rutina ou ác. Clorogênico 5 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 12	Soro anti botrópico i.v.	VBj

4.10 INFLAMAÇÃO LOCAL INDUZIDA PELA PEÇONHA DE *Bothrops jararaca*

Os efeitos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa* sobre a inflamação local induzida pelo VBj foram avaliados de acordo com Texeira (et al., 2005). Camundongos BALB/c receberam pela via intravenosa 100µL de PBS estéril, extratos aquosos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa* nas doses de 10 mg/kg, 15 mg/kg ou 20 mg/kg, as frações de CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH (20 mg/kg) e rutina e ácido clorogênico (1.5, 2 ou 2.5 mg/kg) e

100µL de soro anti-botrópico i.v. Passados cinco minutos (5'), foi injetado, no músculo gastrocnêmio direito, VBj. A solução da peçonha de *B. jararaca* foi preparada diluindo de 0,3 mg/kg em 50 uL de PBS estéril. Imediatamente após o preparo, a solução foi inoculada por via intramuscular (i.m.) no músculo gastrocnêmio direito, enquanto que o músculo gastrocnêmio esquerdo (controle) recebeu o mesmo volume de PBS estéril. Após 24 horas, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg i.p.) e sacrificados por deslocamento cervical. Os coxins direito e esquerdo foram dissecados para avaliação do edema e infiltrado celular.

4.11 DETERMINAÇÃO DO EDEMA

Para medir o edema muscular, 50 uL de peçonha de *B. jararaca* foram injetados no músculo gastrocnêmio direito dos animais; ao mesmo tempo, o músculo contralateral recebeu o mesmo volume de PBS estéril, tal como foi descrito acima. 24 horas após a injeção de VBj, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg i.p.) e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, os coxins esquerdo e direito foram dissecados e pesados. Posteriormente, o edema foi calculado e expresso como a porcentagem do aumento de peso do músculo que recebeu VBj em relação ao músculo contralateral que recebeu apenas PBS estéril (TEIXEIRA et al., 2005). Para controle negativo, foi considerado o coxim esquerdo dos animais tratados cinco minutos previamente com 50µL de PBS pela via intramuscular. Para o controle positivo, foi utilizado o coxim direito, que recebeu VBj em cada animal tratado igualmente com PBS. As atividades do extrato aquoso e frações da *M. tenuiflora* e extrato, frações e compostos isolados da *H. speciosa* foram calculados através do percentual de inibição do edema em animais tratados comparando com camundongos controle. O cálculo da avaliação da inibição do edema foi efetuado segundo a fórmula abaixo.

$$\% \text{ Inibição de Edema} = [\text{nDt} - \text{nEt}] / [\text{nDnt} - \text{nEnt}] \times 100$$

Sendo:

- nDt: média aritmética do peso dos coxins direitos tratados com extrato aquoso e frações da *M. tenuiflora* e extrato, frações e compostos isolados da *H. speciosa*;
- nEt: média aritmética do peso dos coxins esquerdos tratados com extrato aquoso e frações da *M. tenuiflora* e extrato, frações e compostos isolados da *H. speciosa*;
- nDnt: média aritmética do peso dos coxins direitos de animais não tratados;

- nEnt: média aritmética do peso dos coxins esquerdos de animais não tratados.

4.12 QUANTIFICAÇÃO DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO NO MÚSCULO

Para a avaliação do processo inflamatório local, induzido por peçonha de *B. jararaca*, 50 uL VBj foram injetados no músculo gastrocnêmio direito dos animais; ao mesmo tempo, o músculo contralateral recebeu o mesmo volume de PBS estéril, tal como foi descrito anteriormente. 24 horas após a injeção de VBj, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg i.p.) e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, os coxins esquerdo e direito foram dissecados e pesados (TEIXEIRA et al., 2005). Para controle negativo, foi considerado o coxim esquerdo dos animais tratados cinco minutos previamente com 50µL de PBS pela via intramuscular. Para o controle positivo, foi utilizado o coxim direito, que recebeu VBj em cada animal tratado igualmente com PBS. Para a avaliação do processo inflamatório local, o músculo gastrocnêmio foi dissecado, cortado em pedaços menores e, em seguida, homogeneizado, com auxílio de pinças, em 2mL de PBS gelado, para a liberação dos leucócitos do tecido muscular. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 250 x g' por 10 minutos, a 4°C. O *pellet* foi ressuspendido em 0,5mL de PBS gelado. A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer, diluindo o concentrado celular em solução de *Turk* (1:10) para contagem total de leucócitos. Os resultados foram expressos em número de leucócitos/cavidade.

Tabela 7– Distribuição dos grupos em modelo de inflamação local induzida por peçonha de *Bothrops jararaca* (0.6mg/kg), utilizando extrato e frações de *M. tenuiflora* como tratamento de escolha.

Grupos	Tratamento	Intraperitoneal após 5'
Grupo 1	PBS i.v.	PBS
Grupo 2	PBS i.v.	VBj
Grupo 3	Extrato aquoso 10 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 4	Extrato aquoso 15 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 5	Extrato aquoso 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 6	Fração CH ₂ Cl ₂ 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 7	Fração AcOEt 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 8	Fração <i>n</i> -BuOH 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 9	Soro anti botrópico i.v.	VBj

Tabela 8 – Distribuição dos grupos em modelo de inflamação local induzida por peçonha de *Bothrops jararaca* (0.6mg/kg), utilizando extrato aquoso, frações e compostos isolados de *H. speciosa* como tratamento de escolha.

Grupos	Tratamento	Intraperitoneal após 5'
Grupo 1	PBS i.v.	PBS
Grupo 2	PBS i.v.	VBj
Grupo 3	Extrato aquoso 10 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 4	Extrato aquoso 15 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 5	Extrato aquoso 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 6	Fração CH ₂ Cl ₂ 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 7	Fração AcOEt 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 8	Fração <i>n</i> -BuOH 20 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 9	Rutina ou ác. Clorogênico 2 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 10	Rutina ou ác. Clorogênico 2.5 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 11	Rutina ou ác. Clorogênico 5 mg/kg i.v.	VBj
Grupo 12	Soro anti botrópico i.v.	VBj

4.13 AVALIAÇÃO DO ENVENENAMENTO INDUZIDO POR *T. serrulatus*

Primeiramente, fez-se necessário a escolha da dose-desafio do VTs, a qual seria utilizada nos experimentos subsequentes para a avaliação da capacidade de inibição do processo inflamatório, induzido pela peçonha de *T. serrulatus*, pelos extratos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa*; como também ser escolhido o tempo em que a peçonha iria induzir o infiltrado leucocitário mais intenso. A fim de avaliar o envenenamento

induzido por VTs e estabelecer a dose-desafio e o tempo de atividade da peçonha, foi utilizado o modelo experimental de peritonite: grupos de seis camundongos BALB/c machos, de 6 a 8 semanas de idade, foram injetados pela via intraperitoneal (i.p.) com 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.8 mg/kg da peçonha de *T. serrulatus* dissolvido em 100µL PBS estéril. Passados 4, 6 e 8 horas, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg i.p.) e eutanasiados por deslocamento cervical. O exsudato peritoneal foi colhido por laparoscopia, realizando a lavagem peritoneal com 3 mL de PBS gelado. Em seguida, o aspirado foi centrifugado a 250 x g' por 10 minutos, a 4°C. O *pellet* foi ressuspendido em 0,5mL de PBS gelado. A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer, diluindo o concentrado celular em solução de *Turk* (1:10) para contagem total de leucócitos. Os resultados foram expressos em número de leucócitos/cavidade. Depois de selecionar a dose-desafio e o tempo adequado de ação do VTs, foi realizado o ensaio de inibição do processo inflamatório, induzido pela peçonha de *Tityus serrulatus*, pelos extratos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa*.

Tabela 9 – Distribuição dos grupos em modelo de peritonite induzida por peçonha de *T. serrulatus*.

Grupos	Intraperitoneal
Grupo 1	VTs 0.1 mg/kg
Grupo 2	VTs 0.2 mg/kg
Grupo 3	VTs 0.3 mg/kg
Grupo 4	VTs 0.4 mg/kg
Grupo 5	VTs 0.8 mg/kg

4.14 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR PEÇONHA DE *Tityus serrulatus*

Camundongos BALB/c, de 6 a 8 semanas, foram inoculados pela via intravenosa (i.v.) com PBS estéril, extratos aquosos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa* nas doses de 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, as frações CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH (20 mg/kg), rutina e ácido clorogênico (2, 2.5 e 5 mg/kg) i.v. e 100µL do soro anti-aracnídeo pela via

intraperitoneal (i.p.). Cinco minutos (5') após o tratamento com os extratos e frações de *M. tenuiflora* e *H. speciosa*, isolados rutina e ácido clorogênico, e soro anti-aracnídeo, os animais receberam injeção na cavidade peritoneal de 100µL de VTs (0.8 mg/mL) diluído em PBS estéril. Após 6 horas, os camundongos foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg) pela via intraperitoneal e eutanasiados por deslocamento cervical. O exsudato peritoneal foi colhido por laparoscopia, realizando a lavagem peritoneal com 3 mL de PBS gelado. Em seguida, o aspirado foi centrifugado a 250 x g' por 10 minutos, a 4°C. O *pellet* foi ressuscitado em 0,5mL de PBS gelado. A concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer, diluindo o concentrado celular em solução de *Turk* (1:10) para contagem total de leucócitos. Os resultados foram expressos em número de leucócitos/cavidade. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem das citocinas pro-inflamatória IL-1 β , IL-6 e IL-12 por ELISA, seguindo as recomendações do kit da eBioscience. Foram utilizados, como controles negativos, camundongos inoculados apenas com PBS, tanto pela via intraperitoneal, como pela intravenosa; e como controles positivos, camundongos inoculados com VTs pela via intraperitoneal e com PBS pela via intravenosa.

Tabela 10 – Distribuição dos grupos em modelo de envenenamento induzido por *Tityus serrulatus* (0.8 mg/kg), utilizando extrato e frações de *M. tenuiflora* como tratamento de escolha.

Grupos	Tratamento	Intraperitoneal após 5'
Grupo 1	PBS i.v.	PBS
Grupo 2	PBS i.v.	VTs
Grupo 3	Extrato aquoso 10 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 4	Extrato aquoso 15 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 5	Extrato aquoso 20 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 6	Fração CH ₂ Cl ₂ 20 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 7	Fração AcOEt 20 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 8	Fração <i>n</i> -BuOH 20 mg/kg i.v.	VTs

Grupo 9	Soro anti-aracnídeo i.v.	VTs
----------------	--------------------------	-----

Tabela 11 – Distribuição dos grupos em modelo de envenenamento induzido por *Tityus serrulatus* (0.8 mg/kg), utilizando extrato aquoso, frações e compostos isolados de *H. speciosa* como tratamento de escolha.

Grupos	Tratamento	Intraperitoneal após 5'
Grupo 1	PBS i.v.	PBS
Grupo 2	PBS i.v.	VTs
Grupo 3	Extrato aquoso 10 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 4	Extrato aquoso 15 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 5	Extrato aquoso 20 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 6	Fração CH ₂ Cl ₂ 20 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 7	Fração AcOEt 20 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 8	Fração <i>n</i> -BuOH 20 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 9	Rutina ou ác. Clorogênico 1.5 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 10	Rutina ou ác. Clorogênico 2 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 11	Rutina ou ác. Clorogênico 2.5 mg/kg i.v.	VTs
Grupo 12	Soro anti-aracnídeo i.v.	VTs

4.15 DOSAGEM DE CITOCINAS

As citocinas foram quantificadas nos sobrenadantes dos lavados peritoneais por ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de alta afinidade foram recobertas com anticorpos de captura, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0.6M, pH 9.6. As

placas foram incubadas a 4°C durante a noite, lavadas uma vez com PBS-tween 0.05% e incubadas a 37°C, durante 2h, com os sobrenadantes em estudo e uma curva padrão da citocina analisada. As placas foram lavadas seis vezes com PBS-tween 0.05%, os anticorpos secundários marcados com biotina adicionados aos poços e a reação incubada a 37°C durante 1 h. As placas, mais uma vez, foram lavadas, e em seguida adicionado o conjugado avidina-biotina-peroxidase e reação incubada durante 45 minutos a 37°C. A reação foi em seguida revelada com ortofenilenodiamino (OPD) e a reação interrompida com ácido sulfúrico 1N. A leitura da placa será realizada em 450 nm. Foram utilizados kits comerciais de IL-1 β , TNF α , IL-12 e IL-6 obtidos da empresa eBioscience.

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram usados a análise de variância (ANOVA) e o método paramétrico de Tukey e o test t de student para determinar as diferenças entre os grupos. Para realização dessas análises foi utilizado o programa estatístico INSTAT, Graph-Pad, San Diego, Califórnia.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A triagem fitoquímica revelou a presença de fenóis, taninos, alcalóides, saponinas e flavonóides nos extratos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa* (tabela 12).

Através da análise fitoquímica do extrato aquoso da *M. tenuiflora* por CCD, uma mancha amarela (R_f 0,36/ UV 365 nm) foi observada após a pulverização da placa com o Reagente Natural A, sugerindo a presença de flavonóides. Além disso, quando a placa foi revelada com vanilina sulfúrica, foram observadas três manchas vermelhas (R_f s 0,24, 0,34, e 0,43) e uma mancha amarela (R_f 0,36). De acordo com dados da literatura, estes resultados sugerem a presença de terpenos e/ou esteróides, referentes as manchas vermelhas e mais uma vez, sugere que a mancha amarela seja referente a um flavonoide.

Na análise por CCD dos extratos aquosos e frações dos frutos da *H. speciosa* foi observado o seguinte perfil cromatográfico: três manchas majoritárias, uma banda amarela (R_f 0,4), uma mancha azul (R_f 0,9) e uma banda laranja (R_f 0,7). Isso foi observado após a pulverização da placa com o Reagente Natural A, sugerindo a presença de flavonóides. Além disso, quando a placa foi revelada com vanilina sulfúrica, foram observadas duas manchas amarelas (R_f s 0,4 e 0,7) e uma mancha cinza (R_f 0,9). De acordo com Wagner e Bladt (1996), esse perfil cromatográfico é indicativo de presença de flavonóides, com R_f que sugeriram tratar-se de rutina e ácido clorogênico. Posteriormente, foi realizada uma co-cromatografia usando padrões de rutina e ácido clorogênico, confirmando a presença desses compostos no extrato bruto e frações. Todas as amostras analisadas apresentaram perfil cromatográfico semelhante.

Tabela 12 – Resultados da triagem fitoquímica para detecção dos metabólitos secundários encontrados nas plantas em estudo.

Plantas	Metabólito Secundário	Resultado
<i>Hancornia speciosa</i>	Compostos fenólicos e flavonóides	+
	Taninos	+
	Saponinas	+
	Alcalóides	+
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Compostos fenólicos e flavonóides	+
	Taninos	+
	Saponinas	+
	Alcalóides	+

5.2 Análise do extrato da *H. speciosa* por CLAE

A análise qualitativa do extrato aquoso dos frutos de *Hancornia speciosa* por CLAE mostrou a presença de três picos majoritários a 340 nm: pico 1 ($TR = 7,95$ minutos), pico 2 ($TR = 25,44$ minutos) e pico 3 ($TR = 28,48$ minutos). A análise do tempo de retenção (TR) e dos espectros de UV dos picos foi comparada com a literatura. Houve similaridade com os seguintes compostos: ácido clorogênico (325 nm), rutina (259, 266sh, 299sh, 359) e um composto fenólico ainda não identificado, respectivamente (Figura 5) (MABRY, 1970).

A presença de ácido clorogênico (pico 1, figura 5) e rutina (pico2, figura 5) foi confirmada por CLAE, por co-injeção de padrões com o extrato. Após a análise, foi confirmado o aumento da área de superfície sem alterar o espectro de TR dos picos. Os compostos ácido clorogênico e rutina foram identificados previamente em extratos obtidos das cascas (COSTA, 2008) e das folhas (FERREIRA, 2007), respectivamente. Este é o primeiro relato de identificação desses compostos nos frutos da espécie.

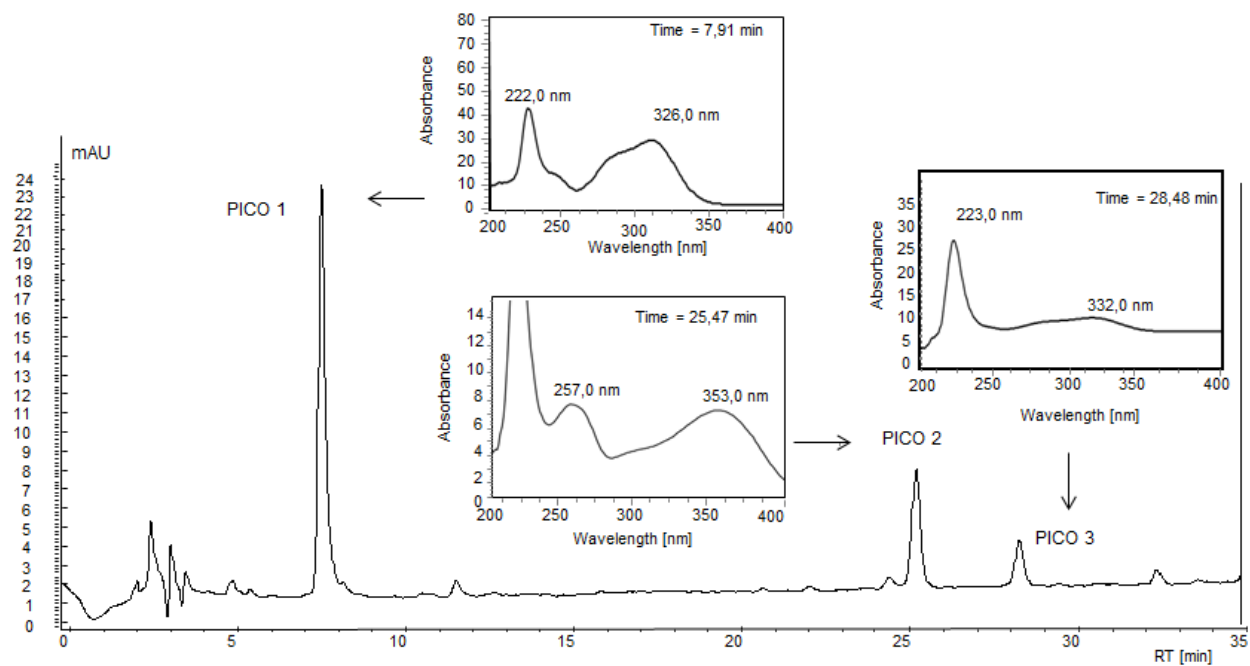


Figura 5 Cromatograma do extrato dos frutos de *H. speciosa* obtido por CLAE.

UV: 340 nm

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DA *Mimosa tenuiflora* E EXTRATO AQUOSO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *Hancornia speciosa* EM MODELO DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

O modelo experimental de peritonite permite avaliar a migração leucocitária, por meio da contagem de leucócitos ($\times 10^6/\text{mL}$) presentes no exudato liberado na cavidade peritoneal após a administração da carragenina. Como esperado, os animais que receberam intravenosamente PBS – e que, trinta minutos depois, receberam também carragenina intraperitonealmente – apresentaram intensa migração leucocitária para o peritônio. Foi observado que os grupos tratados com as diferentes doses dos extratos aquosos da *M. tenuiflora* (Figura 6) e *H. speciosa* (Figura 8) apresentaram uma significativa redução da migração celular para a cavidade peritoneal; bem como demonstraram a capacidade de reduzir os níveis das citocinas pro-inflamatórias IL-6 (Figura 7 (a)), IL-12 (Figura 7(b)), $\text{TNF}\alpha$ (Figura 7(c)) e IL-1 β (Figura 7(d)) para a Jurema-Preta e IL-6 (Figura 9 (a)), IL-12 (Figura 9 (b)), $\text{TNF}\alpha$ (Figura 9 (c)) and IL-1 β (Figura 9 (d)) para a mangabeira – quando comparados com o grupo que recebeu apenas a carragenina.

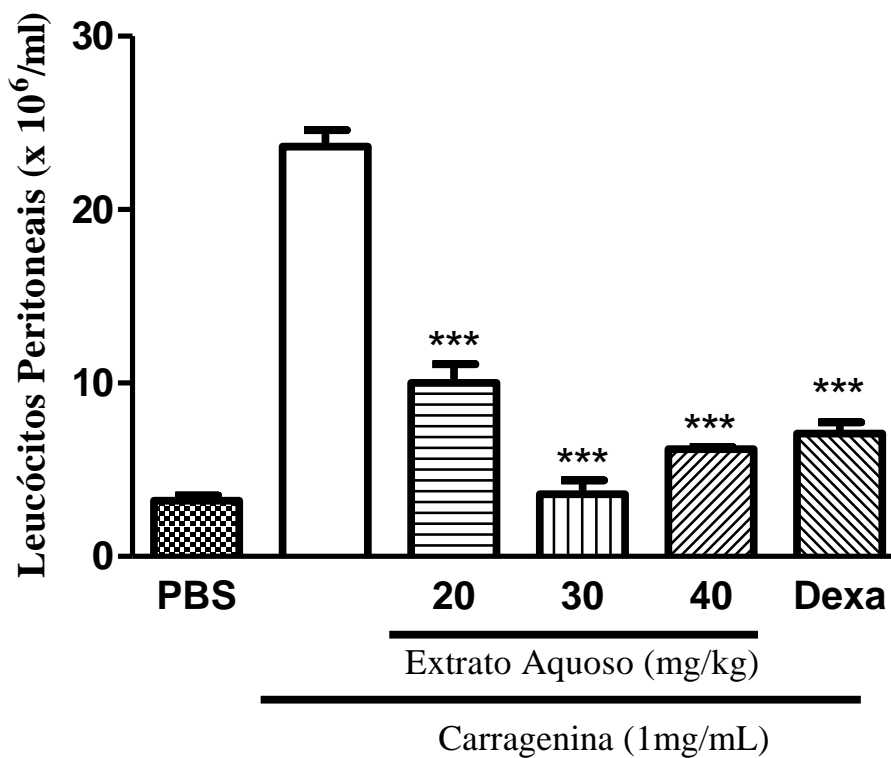


Figura 6 Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* em modelo de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 20, 30 e 40 mg/kg, pela via intravenosa, e com dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado e o número de células determinado em câmara de Neubauer *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

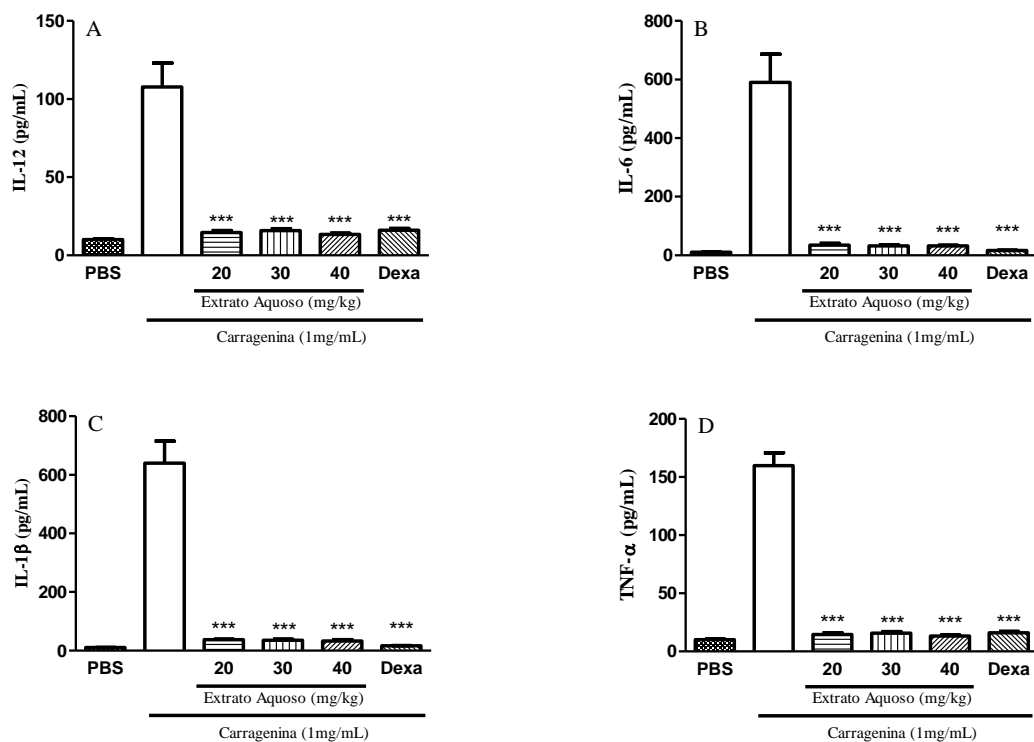


Figura 7 Efeito da administração do extrato aquoso de *M. tenuiflora* sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1 β e TNF- α , no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 20, 30 e 40 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, centrifugado, e, com o sobrenadante, foi realizado a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e TNF- α (D) por ELISA. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

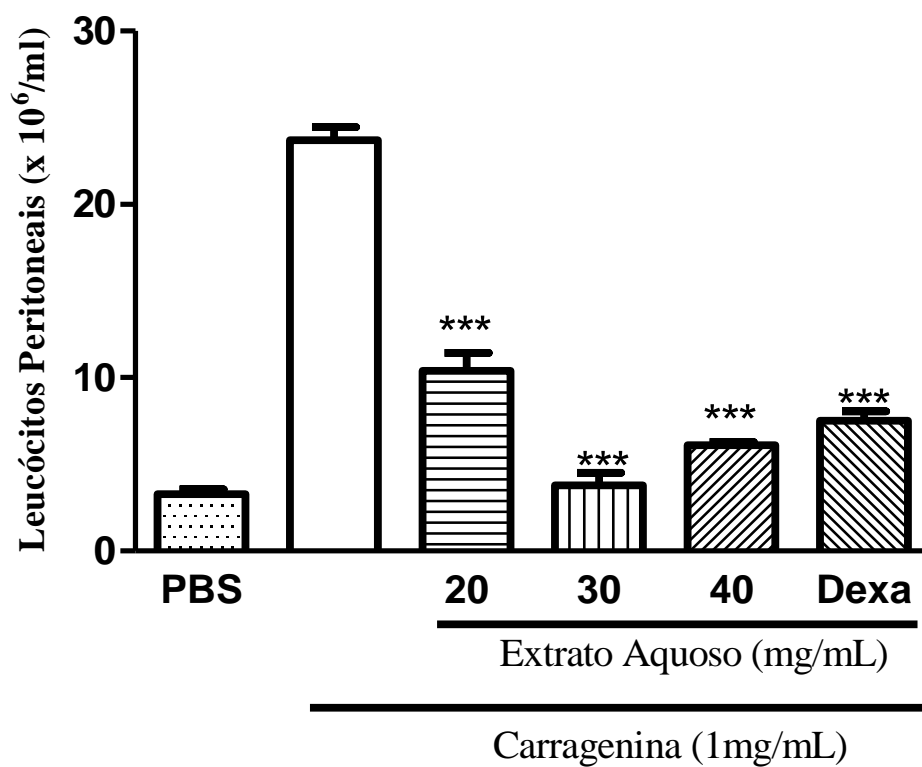


Figura 8 Efeito do extrato aquoso de *H. speciosa* em modelo de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 20, 30 e 40 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

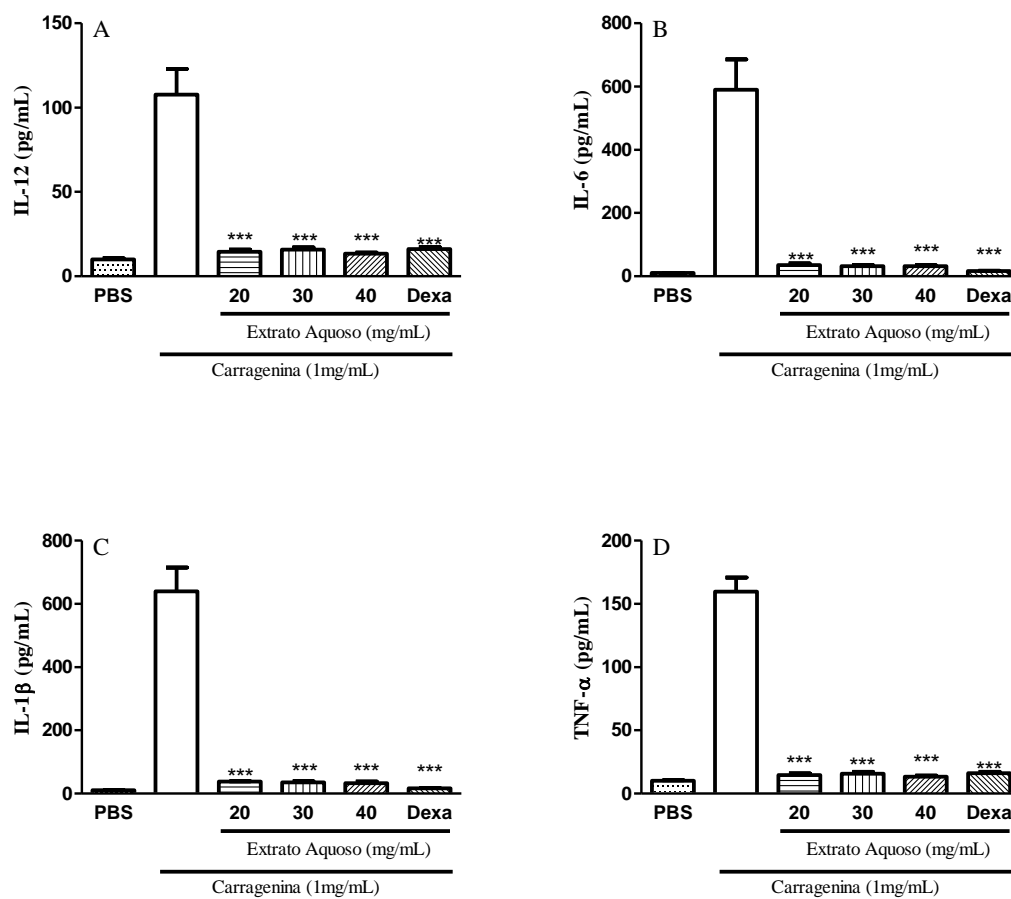


Figura 9 Efeito da administração do extrato aquoso de *H. speciosa* sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1 β e TNF- α , no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 20, 30 e 40 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, centrifugado, e, com o sobrenadante, foi realizado a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e TNF- α (D) por ELISA. ***P \leq 0,001, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

Posteriormente, nós avaliamos a atividade anti-inflamatória das frações CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH das plantas em estudo. Todas as frações foram capazes de reduzir o infiltrado inflamatório (Figuras 10 e 12, *M. tenuiflora* e *H. speciosa* respectivamente) e a produção de citocinas no exudato peritoneal: IL-6 (Figura 11 (a)), IL-12 (Figura 11 (b)), TNF α (Figura 11 (c)) e IL-1 β (Figura 11 (d)) para a *M. tenuiflora*; e IL-6 (Figura 13 (a)), IL-12 (Figura 13 (b)), TNF α (Figura 13 (c)) e IL-1 β (Figura 13 (d)) para a *H. speciosa*. Por fim, foi avaliada a ação dos compostos isolados, rutina e ácido clorogênico, obtidos do extrato aquoso da *H. speciosa*, frente à inflamação induzida

pela carragenina. Pôde-se observar que tanto o ác. Clorogênico (Figura 14) quanto a rutina (Figura 16) reduziram o influxo celular para a cavidade peritoneal – como também inibiram a produção das citocinas IL-6 (Figura 15 (a)), IL-12 (Figura 15 (b)), TNF α (Figura 15 (c)) e IL-1 β (Figura 15 (d)) para o ác. Clorogênico; e IL-6 (Figura 17 (a)), IL-12 (Figura 17 (b)), TNF α (Figura 17 (c)) e IL-1 β (Figura 17 (d)) para a rutina.

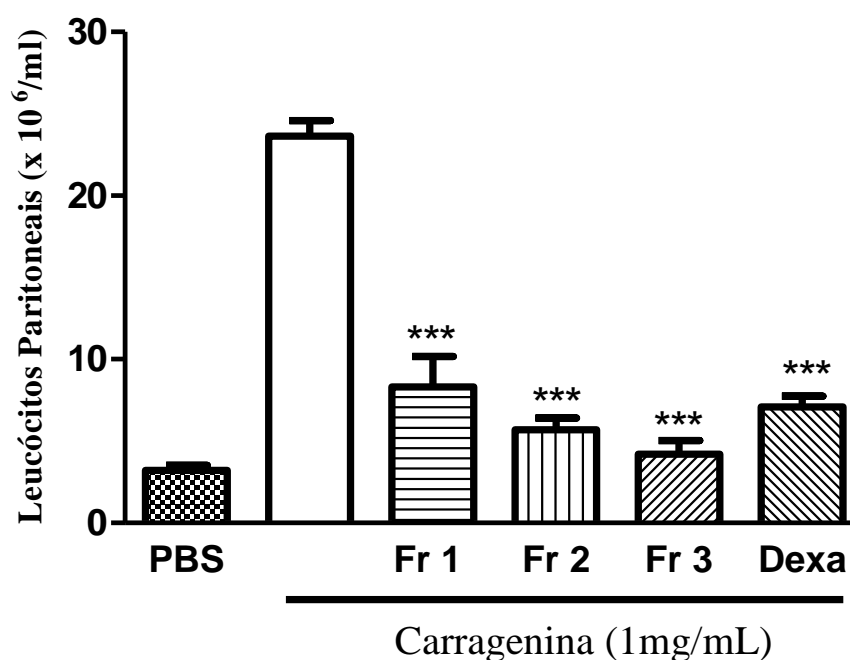


Figura 10 Efeito das frações CH₂Cl₂, AcOEt, e *n*-BuOH da *M. tenuiflora* em modelo de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH₂Cl₂ (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. ***P \leq 0,001, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

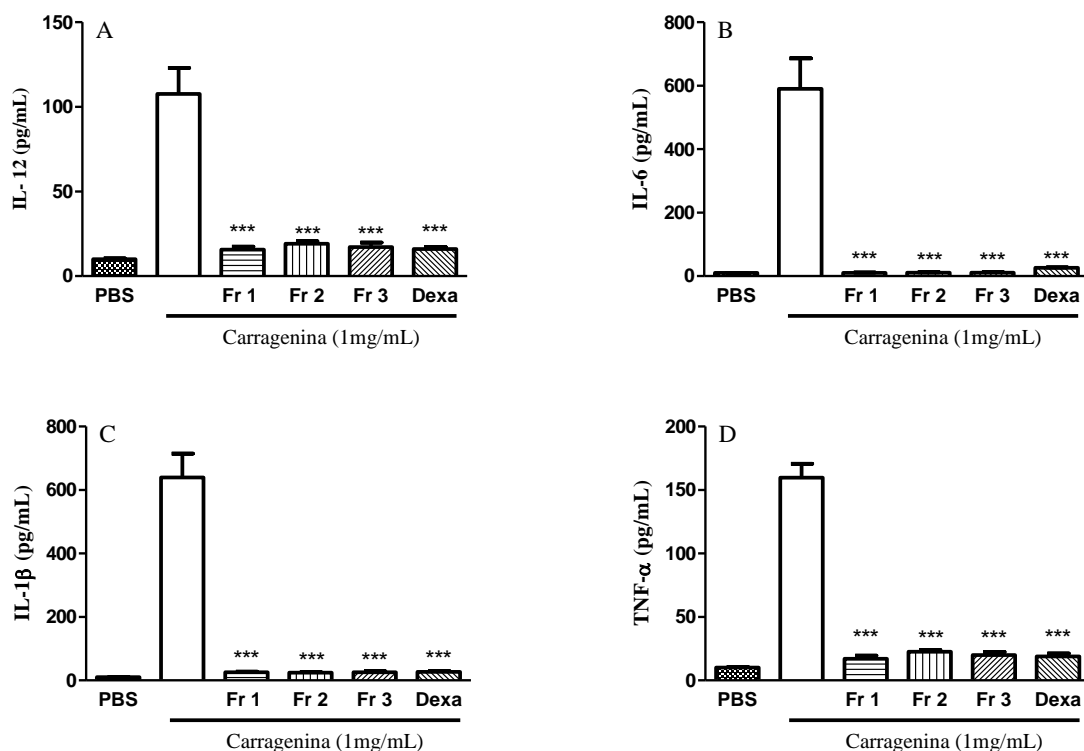


Figura 11 Efeito da administração das frações CH_2Cl_2 , AcOEt, e *n*-BuOH da *M. tenuiflora* sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1 β e TNF- α , no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH_2Cl_2 (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, centrifugado, e, com o sobrenadante, foi realizada a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e TNF- α (D) por ELISA. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

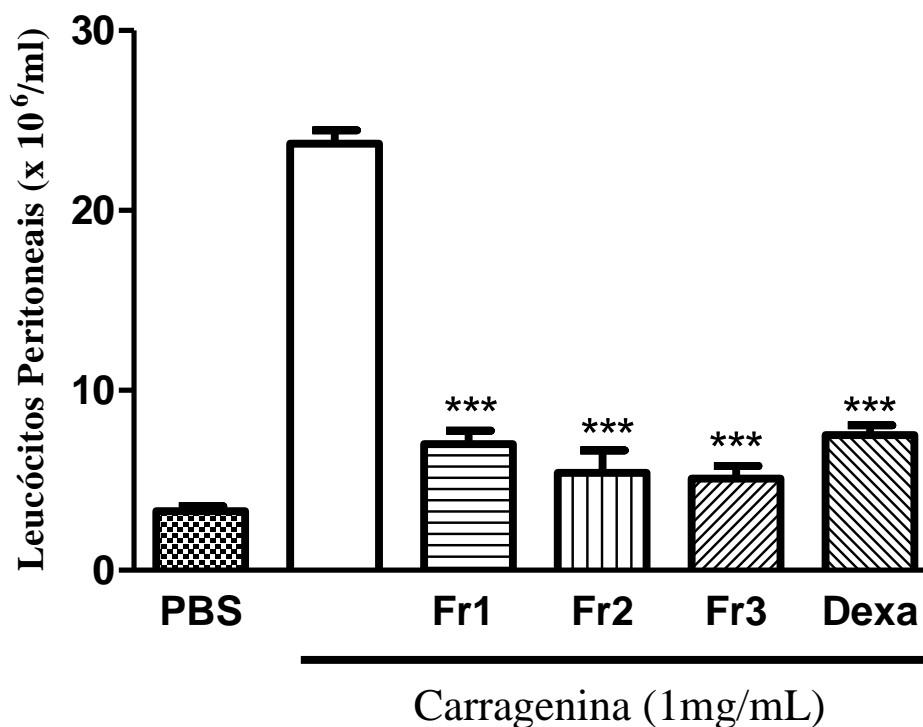


Figura 12 Efeito das frações CH_2Cl_2 , AcOEt, e *n*-BuOH da *H. speciosa* em modelo de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH_2Cl_2 (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

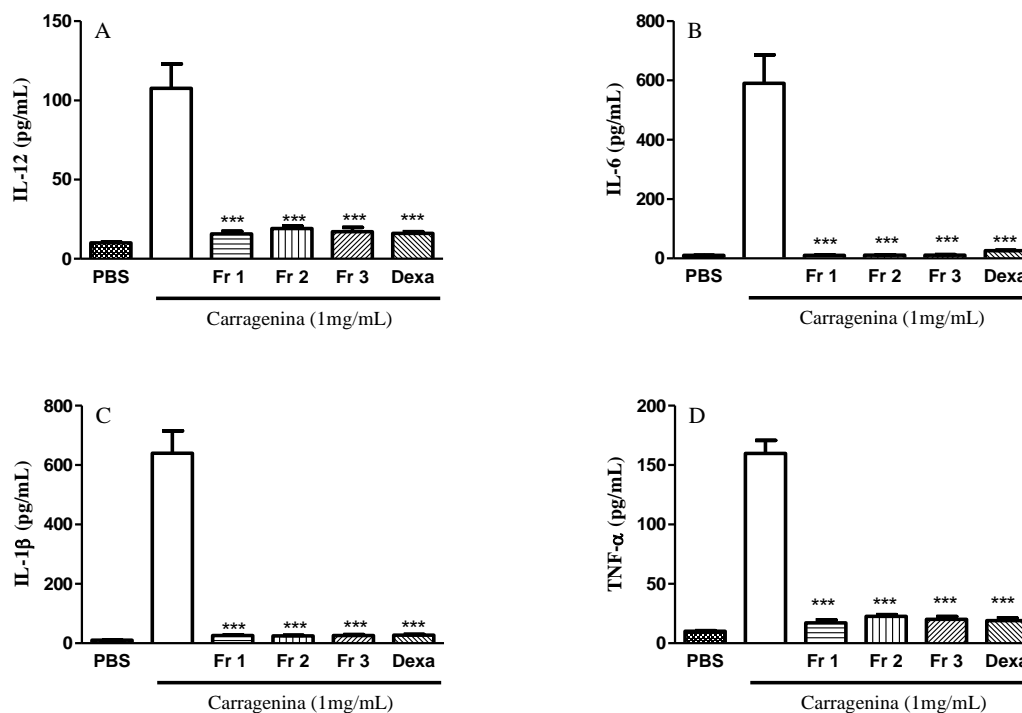


Figura 13 Efeito da administração das frações CH_2Cl_2 , AcOEt, e *n*-BuOH da *H. speciosa* sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1 β e TNF- α , no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH_2Cl_2 (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, centrifugado, e, com o sobrenadante, foi realizado a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e TNF- α (D) por ELISA. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

Para uma maior fidedignidade dos dados apresentados, foi utilizada um fármaco de referência, a dexametasona, que é um anti-inflamatório esteroidal comercialmente conhecido. Sendo assim, inibiu-se, de forma significativa, a migração celular para a cavidade peritoneal, como também a produção de citocinas pro-inflamatórias, dos animais que receberam a carragenina e foram previamente tratados com a dexametasona. Pôde ser observado ainda que não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com os extratos brutos e frações da *M. tenuiflora*, os com extrato bruto, frações, rutina e ác. Clorogênico da *H. speciosa*, e o grupo tratado com a dexametasona – ou seja, todos foram capazes, de maneira semelhante, de diminuir significativamente a migração celular para a cavidade peritoneal daqueles animais que receberam carragenina. Portanto, quando comparado ao grupo controle

positivo, que recebeu carragenina no peritônio e PBS intravenoso, pode-se afirmar que tanto a dexametasona quanto as plantas *M. tenuiflora* e *H. speciosa* apresentaram atividade anti-inflamatória.

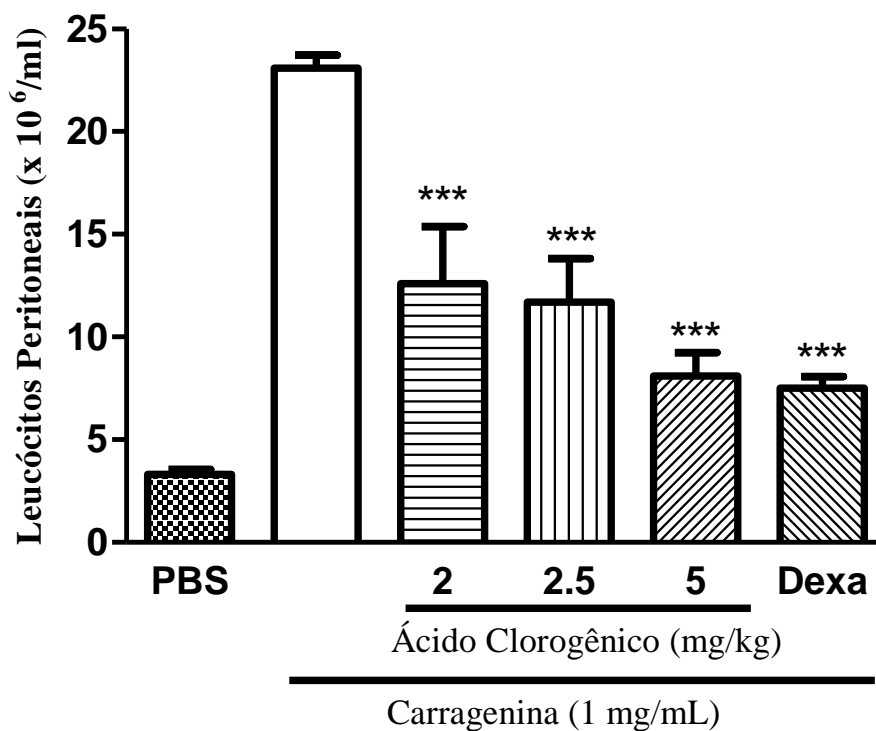


Figura 14 Efeito do Ácido Clorogênico em modelo de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com o ácido clorogênico, nas doses de 2, 2.5 e 5 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. ***P ≤ 0,001, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

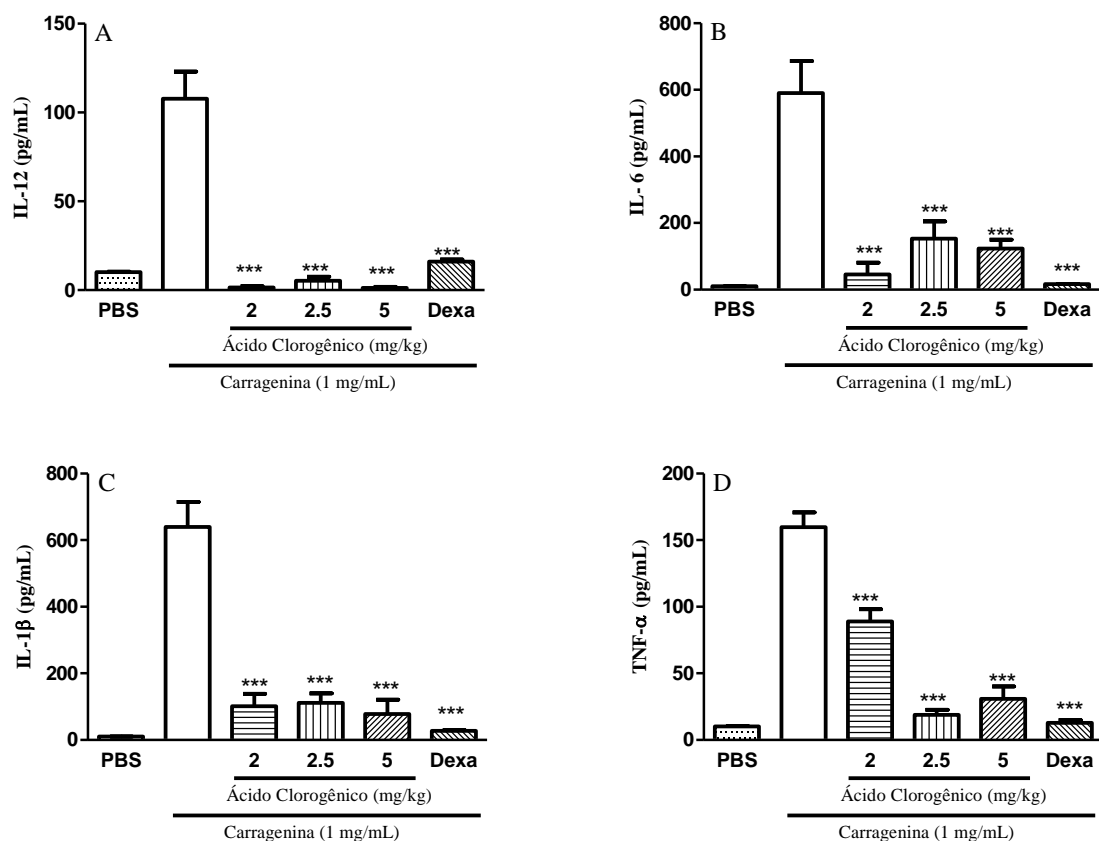


Figura 15 Efeito do Ácido Clorogênico sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1 β e TNF- α , no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com o ácido clorogênico, nas doses de 2, 2.5 e 5 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, centrifugado, e, com o sobrenadante, foi realizado a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e TNF- α (D) por ELISA. *** $P \leq 0,001$, comparado com salina/salina e os demais grupos tratados. N= 6

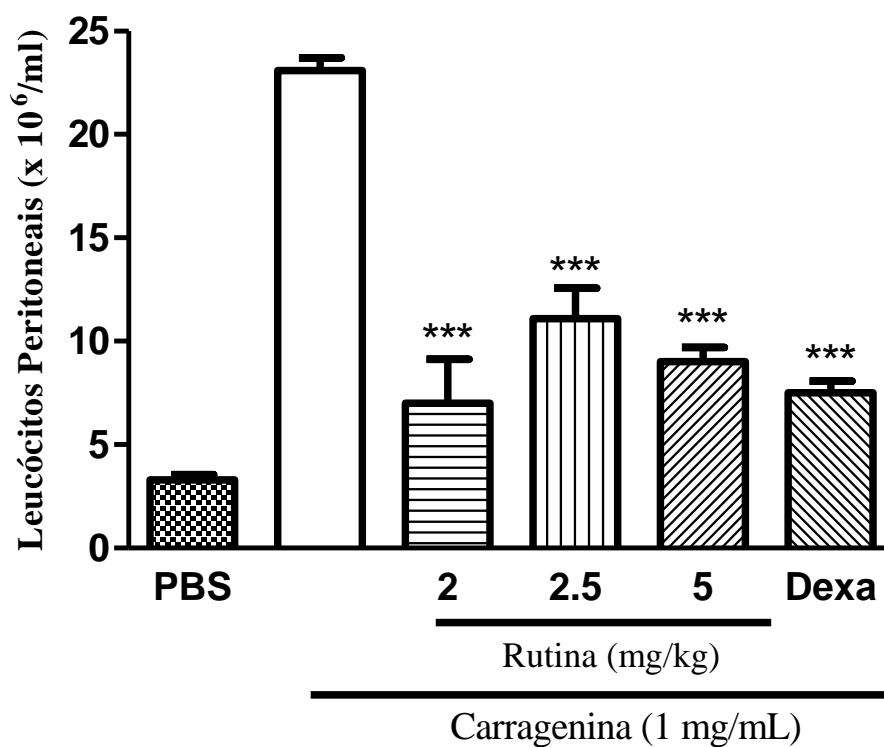


Figura 16 Efeito da Rutina em modelo de peritonite induzida por carragenina Camundongos BALB/c foram tratados com rutina, nas doses de 2, 2.5 e 5 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

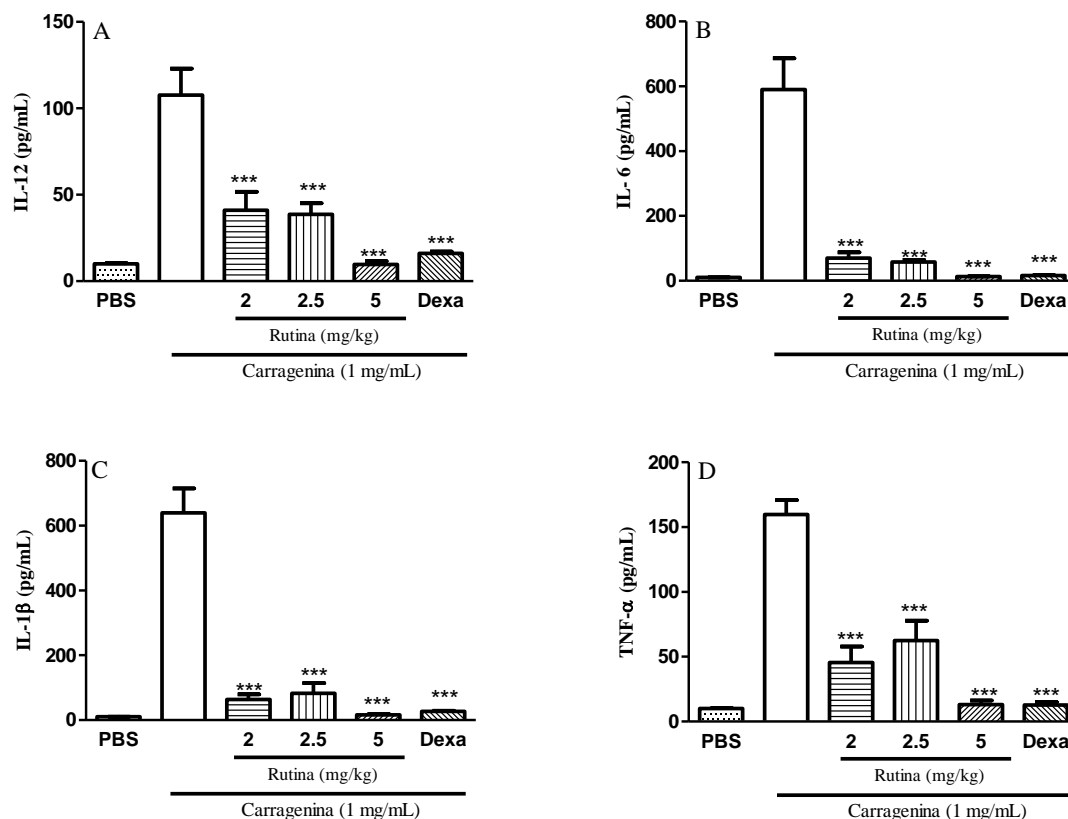


Figura 17 Efeito da administração de Rutina sobre os níveis de IL-12, IL-6, IL-1 β e TNF- α no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina. Camundongos BALB/c foram tratados com rutina, nas doses de 2, 2,5 e 5 mg/kg, pela via intravenosa, e dexametasona na dose de 0,5 mg/kg intraperitonealmente. Trinta minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 1 mL de carragenina 1% (1 mg/mL). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, centrifugado, e, com o sobrenadante, foi realizado a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e TNF- α (D) por ELISA. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo Carragenina e os demais grupos tratados N= 6.

5.4 AVALIAÇÃO DO ENVENENAMENTO INDUZIDO POR *B. jararaca*

A peçonha de *B. jararaca* tem como característica induzir hemorragia, que vem acompanhada de uma resposta inflamatória intensa depois de injetada na vítima. Portanto, foi necessário selecionar a dose adequada de VBj, para que induzisse uma resposta inflamatória significativa, não desenvolvendo, no entanto, o quadro de hemorragia. Com isso, o envenenamento induzido por VBj foi avaliado usando um modelo experimental de peritonite. Observou-se um aumento significativo na migração das células para a cavidade peritoneal após a injeção de VBj intraperitonealmente. Entre as doses testadas, o influxo leucocitário mais intenso foi obtido com 0,3 mg/kg (Figura

18). Esta dose foi escolhida como a dose-desafio para a avaliação da atividade antiveneno do extrato aquoso e frações de *M. tenuiflora* e extrato aquoso, frações e compostos isolados da *Hancornia speciosa*.

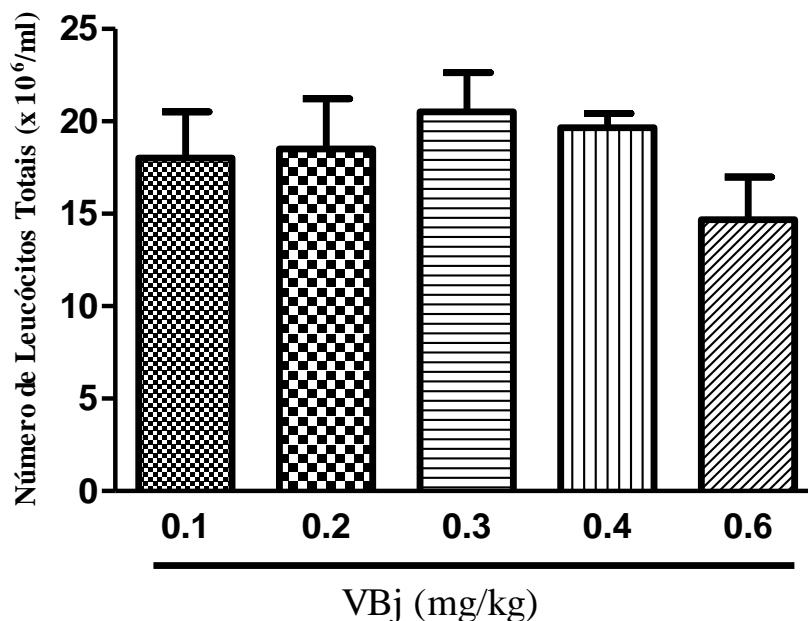


Figura 18 Avaliação do envenenamento induzido pela peçonha de *B. jararaca*, escolha da dose-desafio. Camundongos BALB/c receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VBj em diferentes doses (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.6mg/kg). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer N= 6.

5.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DA *Mimosa tenuiflora* E EXTRATO AQUOSO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *Hancornia speciosa* EM MODELO DE ENVENENAMENTO INDUZIDO POR *B. jararaca*

Escolhida a dose-desafio, o próximo passo foi avaliar se as plantas em estudo teriam a capacidade de reduzir, ou até mesmo inibir, a inflamação ocasionada pela peçonha da *B. jararaca*. Como já foi citado anteriormente, o envenenamento induzido por VBj tem a capacidade de induzir uma resposta inflamatória intensa. Nesse modelo experimental de envenenamento, pudemos avaliar a migração leucocitária para a cavidade peritoneal, por meio da contagem global de leucócitos (x10⁶/mL), após a administração da VBj. Como já era esperado, os animais que receberam

intravenosamente PBS e, cinco minutos depois, foram administrados com VBj intraperitonealmente, apresentaram intensa migração leucocitária para o peritônio.

Por outro lado, observou-se que os grupos tratados com as doses 15mg/kg e 20mg/kg do extrato aquoso da *M. tenuiflora* (Figura 19) e todas as doses administradas do extrato aquoso da *H. speciosa* (Figura 20) revelaram uma significativa redução da migração celular para a cavidade peritoneal – enquanto que a dose de 10mg/kg da *M. tenuiflora* foi incapaz de reduzir o influxo leucocitário, não apresentando, assim, atividade anti-inflamatória frente à peçonha de *B. jararaca*.

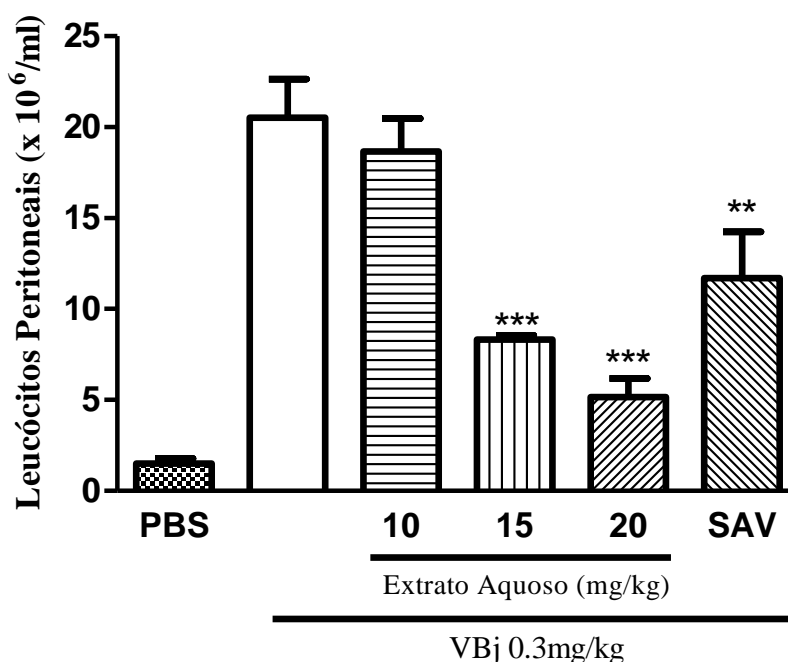


Figura 19 Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* em modelo de envenenamento induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 10, 15 e 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100µL de soro antibotrópico (SAV) intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100µL de VBj (0.3mg/kg). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. ***P ≤ 0,001, comparado o grupo VBj e os demais grupos tratados N= 6.

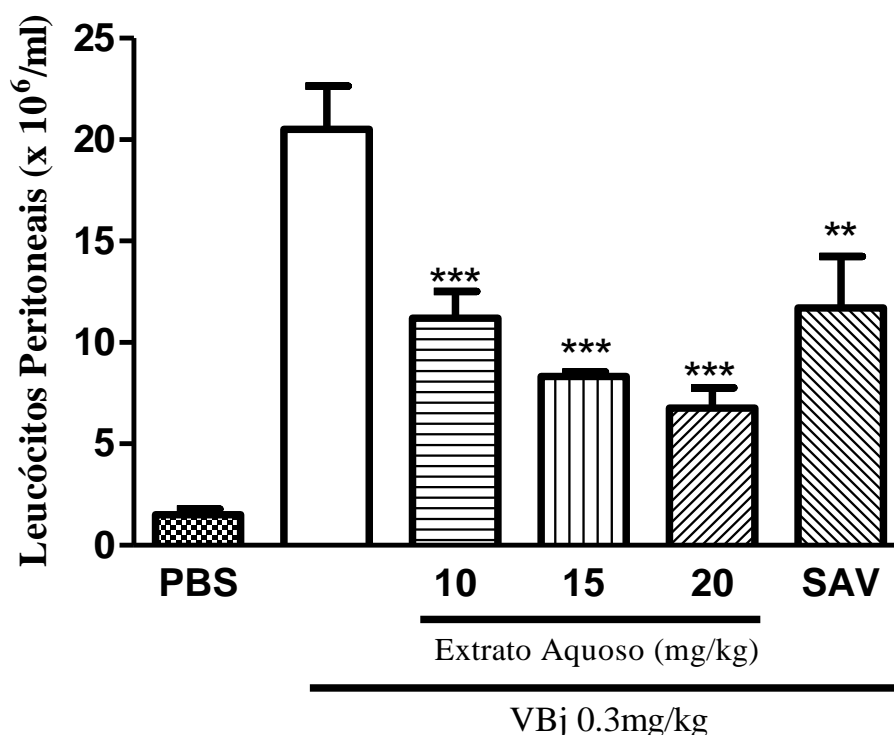


Figura 20 Efeito do extrato aquoso de *H. speciosa* em modelo de envenenamento induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 10, 15 e 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100µL de soro antibotrópico (SAV) intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100µL de VBJ (0.3mg/kg). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VBJ e os demais grupos tratados $N= 6$.

Posteriormente, foi avaliada a atividade anti-inflamatória das frações CH_2Cl_2 , AcOEt e *n*-BuOH da *M. tenuiflora* (Figura 21) e *H. speciosa* (Figura 22). Todas as frações foram capazes de reduzir o infiltrado inflamatório na cavidade peritoneal. Para uma maior fidedignidade dos dados apresentados, foi utilizado o soro antibotrópico, que é utilizado como tratamento de escolha em casos de acidentes ofídicos por *B. jararaca*. Como o SAV tem a capacidade de inibir a ação da VBJ, conseguiu-se reduzir, de forma significativa, o influxo leucocitário.

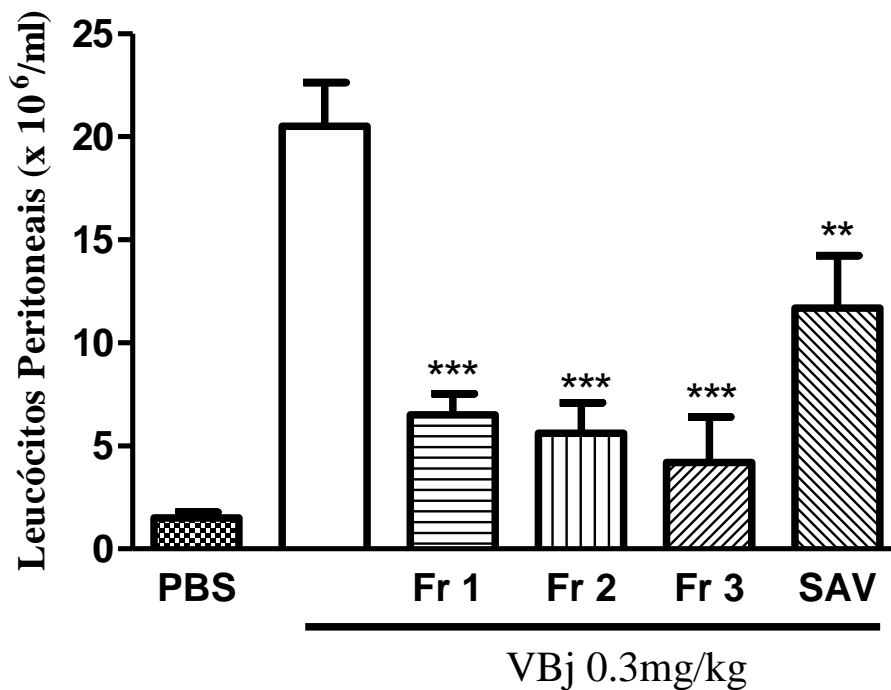


Figura 21 Efeito das frações CH_2Cl_2 , AcOEt, e *n*-BuOH da *M. tenuiflora* em modelo de envenenamento induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH_2Cl_2 (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μL de soro antibotrópico (SAV) intraperitonealmente. Cinco minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μL de VBJ (0.3mg/kg). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VBJ e os demais grupos tratados N= 6.

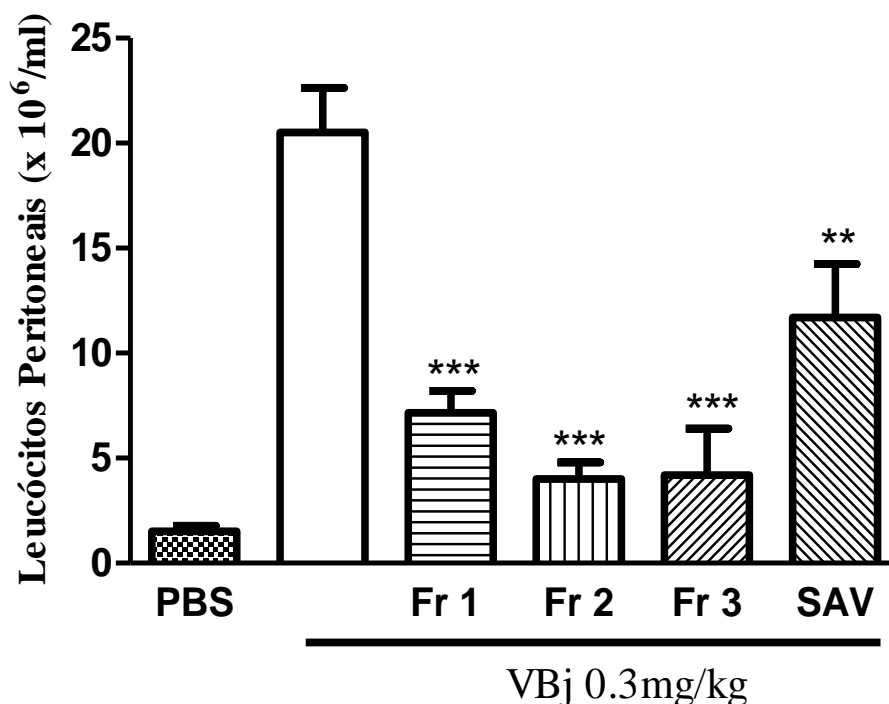


Figura 22 Efeito das frações CH_2Cl_2 , AcOEt, e *n*-BuOH da *H. speciosa* em modelo de envenenamento induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH_2Cl_2 (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μL de soro antibotrópico (SAV) intraperitonealmente. Cinco minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μL de VBJ (0.3mg/kg). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VBJ e os demais grupos tratados N= 6.

Seguindo com o processo de fracionamento do extrato da *H. speciosa*, foi testada a capacidade dos compostos isolados (rutina e ácido clorogênico) de inibir a resposta inflamatória induzida pela peçonha de *B. jararaca*. Observou-se que tanto o ácido clorogênico (Figura 23) quanto a rutina (figura 24) reduziram, de forma significativa, o influxo leucocitário para a cavidade peritoneal.

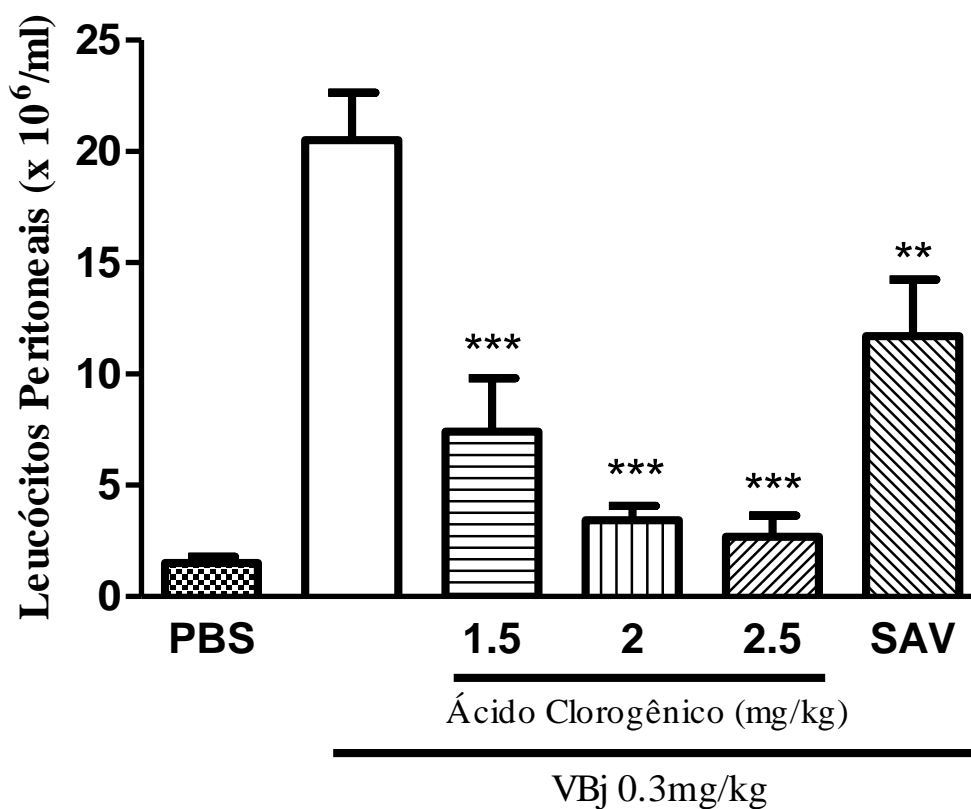


Figura 23 Efeito do **Ácido Clorogênico** em modelo de envenenamento induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com o ácido clorogênico, nas doses de 1.5, 2 e 2.5 mg/kg, pela via intravenosa, e 100µL de soro antibotrópico (SAV) intraperitonealmente. Cinco minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100µL de VBj (0.3mg/kg). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. ***P ≤ 0,001, comparado o grupo VBj e os demais grupos tratados N= 6.

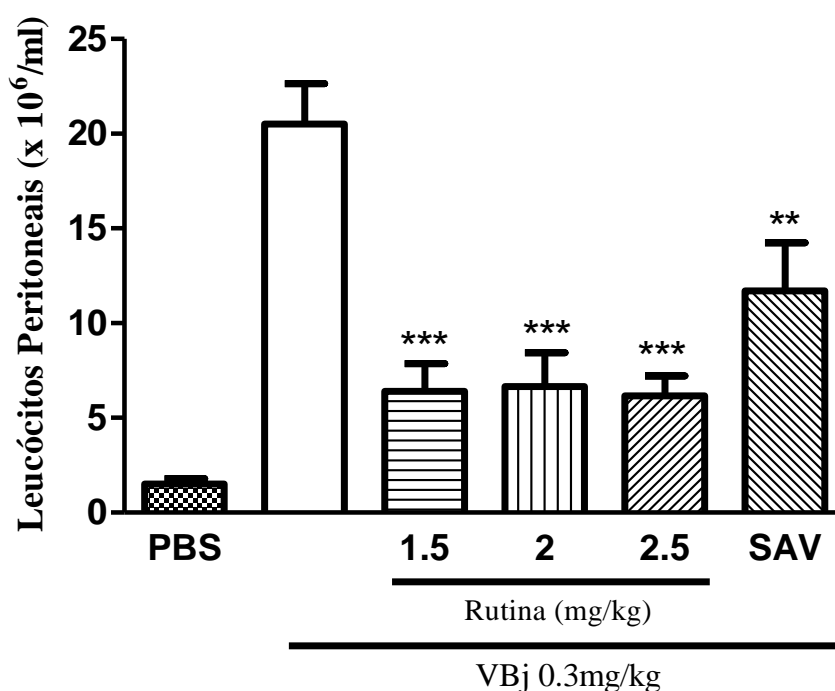


Figura 24 Efeito da Rutina em modelo de envenenamento induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com rutina, nas doses de 1.5, 2 e 2.5 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μ L de soro antibotrópico (SAV) intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VBj (0.3mg/kg). Após 4 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VBj e os demais grupos tratados N= 6.

Foi observado, ainda, que houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com o extrato bruto da *M. tenuiflora*, sendo as maiores doses as mais potentes; enquanto que as frações foram capazes, de maneira semelhante, de diminuir significativamente a migração celular para a cavidade peritoneal daqueles animais que foram envenenados com VBj. Quando comparados, o grupo tratado com SAV e os grupos que foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 15mg/kg e 20mg/kg, das frações CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH da *M. tenuiflora* e extrato aquoso, frações e compostos isolados (rutina e ácido clorogênico) da *H. speciosa*, é possível observar que houve diferença estatística significativa – tendo a *M. tenuiflora* e a *H. speciosa* um desempenho superior ao soro antibotrópico no que tange à redução da inflamação causada pela peçonha. Portanto, quando comparado ao grupo controle positivo, que recebeu VBj no peritônio e PBS intravenoso, o SAV e as espécies vegetais em estudo apresentaram a capacidade de reduzir a inflamação ocasionada pelo envenenamento

induzido pela *B. jararaca*. Para esse modelo experimental, foi realizada a dosagem de citocinas pro-inflamatórias do soro e do exudato peritoneal dos animais submetidos à administração da peçonha. Foi possível observar que não houve expressão desses mediadores inflamatórios em níveis detectados pelo kit de ELISA utilizado.

5.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DA *Mimosa tenuiflora* E EXTRATO AQUOSO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *Hancornia speciosa* EM MODELO DE INFLAMAÇÃO LOCAL INDUZIDO PELA PEÇONHA DE *B. jararaca*

O próximo passo foi avaliar a inflamação local induzida pela injeção de VBj. Com isso foi observado o efeito de *M. tenuiflora* e *H. speciosa* na inibição do processo inflamatório local induzido pela peçonha de *B. jararaca*. A inflamação foi avaliada por múltiplos parâmetros. O edema local e a migração de células polimorfonucleares para o local da injeção de VBj.

A injeção intramuscular de 0.6 mg/kg da peçonha de *B. jararaca* causou intenso edema, com halos hemorrágicos e consequente extravasamento do plasma, causando também formação de edema e aumento do volume do músculo gastrocnêmio dos animais que receberam, intravenosamente, o PBS e cinco minutos depois foram administrados VBj pela via intramuscular no coxim direito, 24 horas após a injeção da peçonha, em comparação com o controle (músculo gastrocnêmio do coxim esquerdo). Foi observado que o tratamento dos animais com as diferentes doses do extrato aquoso de *M. tenuiflora* (10, 15 e 20 mg/kg) (Tabela 13) apresentaram significativa diminuição do edema no músculo – sendo que a dose de 20mg/kg apresentou melhor atividade antiflogística, reduzindo em 98% o edema formado após a aplicação do VBj, sendo a dose de escolha para a avaliação das atividade antiedematogênica das frações CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH da *M. tenuiflora* (Tabela 13), as quais mostraram-se eficazes na redução da formação do edema 24 horas após a injeção da peçonha quando comparado com o grupo que só foi administrado VBj, porém a fração butanólica apresentou melhores resultados, reduzindo o edema em 70%. Com relação aos extratos da *H. speciosa*, foi observada uma resposta mais eficaz em doses maiores (Tabela 14), reduzindo o edema em 65% na dose de 20mg/kg. A atividade das frações CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH (Tabela 14) foi avaliada e todas conseguiram reduzir a formação do edema, sendo a fração acetato de etila a que apresentou melhor resultado, inibindo a

formação do edema em 65%. Seguindo com os ensaios de fracionamento biomonitorado da *H. speciosa*, foram testados os compostos isolados rutina e o ácido clorogênico (Tabela 15). Como esperado, a rutina apresentou melhores resultados, na dose de 2.5mg/kg (81% de inibição). Já o ácido clorogênico apresentou uma significativa atividade antiflogística em doses menores (1.5mg/kg – redução de 81% do edema), demonstrando uma melhor atividade do que o extrato bruto e as frações. Portanto, é possível sugerir que esses compostos estão contribuindo de forma efetiva para a atividade anti-inflamatória da *H. speciosa*, pois, à medida que fraciona-se o extrato, paralelamente ocorre um aumento significativo na atividade biológica.

O soro antibotrópico foi utilizado para uma maior confiabilidade dos dados. O tratamento com o soro inibiu significativamente a formação de edema. Portanto, quando comparado com o controle positivo (grupo VBj) – os grupos tratados com *M. tenuiflora* e *H. speciosa* –, as plantas exibiram atividade anti-inflamatória local, demonstrando a capacidade de inibir formação de edema pela peçonha de *B. jararaca*.

Tabela 13 – Avaliação da atividade antiflogística dos extratos e frações da *M. tenuiflora* em modelo de inflamação local induzida pela peçonha de *B. jararaca*.

Grupos	Dose (mg/kg)	Diferença (mg)	Inibição %
VBj	0.6	314.30 ± 0.03984	--
Extrato Aquoso	10	46.30 ± 0.2047	85
Extrato Aquoso	15	72.67 ± 0.08676	77
Extrato Aquoso	20	5.40 ± 0.05008	98
Fração CH ₂ Cl ₂	20	128.50 ± 0.09522	59
Fração EtOAc	20	138.90 ± 0.07033	56
Fração <i>n</i> -BuOH	20	92.93 ± 0.06840	70

SAV	100	117.30 ± 0.07357	63
-----	-----	------------------	----

Tabela 14 – Avaliação da atividade antiflogística dos extratos e frações da *H. speciosa* em modelo de inflamação local induzida pela peçonha de *B. jararaca*

Grupos	Dose (mg/kg)	Diferença (mg)	Inibição %
VBj	0.6	314.30 ± 0.03984	--
Extrato Aquoso	10	178.20 ± 0.08509	43
Extrato Aquoso	15	213.80 ± 0.08286	32
Extrato Aquoso	20	109.40 ± 0.1219	65
Fração CH ₂ Cl ₂	20	156.00 ± 0.08671	50
Fração EtOAc	20	86.54 ± 0.06060	72
Fração <i>n</i> -BuOH	20	139.60 ± 0.07609	56
SAV	100	117.30 ± 0.07357	63

Tabela 15 – Avaliação da atividade antiflogística da rutina e ácido clorogênico isolados da *H. speciosa* em modelo de inflamação local induzida pela peçonha de *B. jararaca*.

Grupos	Dose (mg/kg)	Diferença (mg)	Inibição %
VBj	0.6	314.30 ± 0.03984	--
Rutina	1.5	180.50 ± 0.08734	43
Rutina	2	159.90 ± 0.1132	49
Rutina	2.5	58.66 ± 0.1145	81
Ácido Clorogênico	1.5	59.97 ± 0.06367	81
Ácido Clorogênico	2	191.10 ± 0.1613	39
Ácido Clorogênico	2.5	202.70 ± 0.09596	36
SAV	100	117.30 ± 0.07357	63

O número de leucócitos infiltrados no músculo gastrocnêmio foi determinado 24h após a injeção intramuscular de 0.6 mg/kg da peçonha de *B. jararaca*. O VBj induziu um intenso influxo de leucócitos para o músculo gastrocnêmio. Por outro lado, os animais que foram tratados com as três doses diferentes (10, 15 e 20 mg/kg) do extrato aquoso (Figura 25) e as frações CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH da *M. tenuiflora* (Figura 26), como também o extrato bruto nas doses 10, 15 e 20 mg/kg (Figura 27), frações CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH na dose de 20mg/kg (Figura 28) e compostos isolados ácido clorogênico e rutina (Figuras 29 e 30 respectivamente), nas doses de 1.5, 2 e 2.5mg/kg da *H. speciosa*, apresentaram a capacidade de reduzir, de forma eficiente, a migração leucocitária para o músculo que recebeu a injeção de VBj, quando comparado com o grupo controle positivo (VBj). O soro antibotrópico foi utilizado

como controle negativo. O tratamento com o soro inibiu significativamente a migração leucocitária para o músculo. Portanto, quando comparados com o controle positivo (grupo VBj), os grupos tratados com *M. tenuiflora* exibiram atividade anti-inflamatória local, demonstrando a capacidade de reduzir o dano tecidual ocasionado pela peçonha de *B. jararaca*. Quando comparados os grupos tratados com as plantas em estudo e o grupo que recebeu o soro antibotrópico, percebe-se que não houve diferença estatística entre os grupos analisados, confirmando a ação anti-inflamatória de VBj da *H. speciosa* e da *M. tenuiflora*.

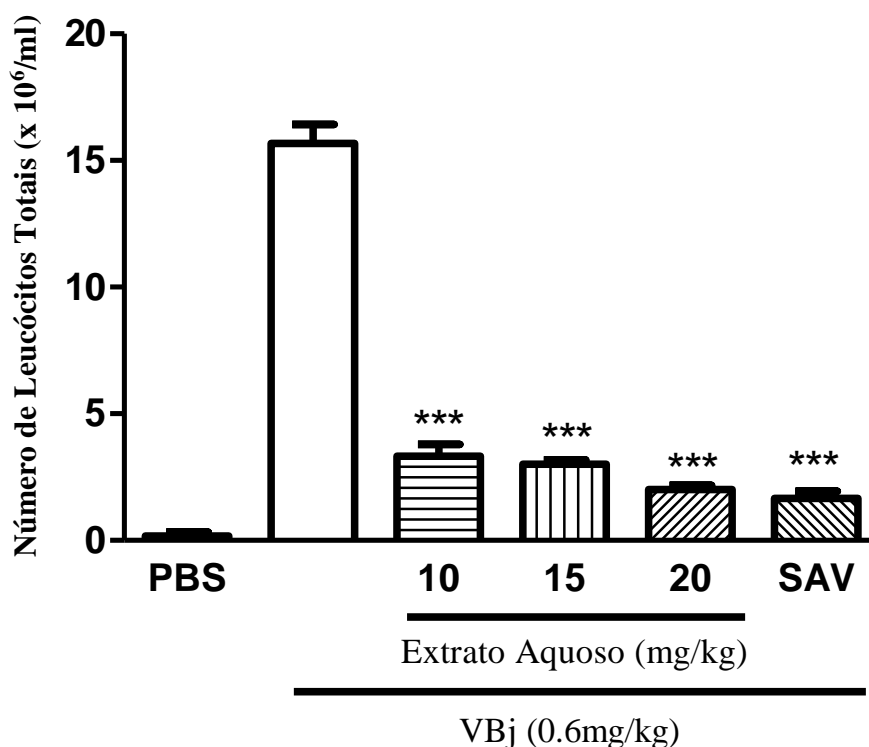


Figura 25 Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* em modelo experimental de inflamação local induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 10, 15 e 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100µL de soro antibotrópico (SAV), intraperitonealmente. Cinco minutos depois, receberam, pela via intramuscular, 50µL de VBj (0.6mg/kg). Após 24 horas, o músculo foi dissecado e homogeneizado com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VBj e os demais grupos tratados N= 6.

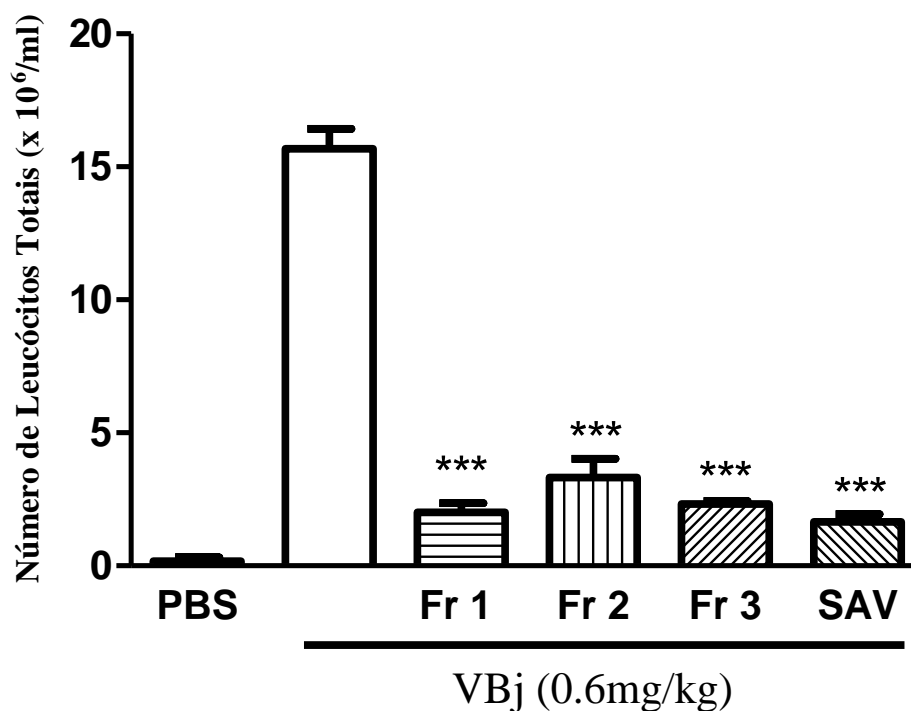


Figura 26 Efeito das frações CH₂Cl₂, AcOEt, e *n*-BuOH da *M. tenuiflora* em modelo experimental de inflamação local induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH₂Cl₂ (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100µL de soro antibotrópico (SAV), intraperitonealmente. Cinco minutos depois, receberam, pela via intramuscular, 50µL de VBJ (0.6mg/kg). Após 24 horas o músculo foi dissecado e homogeneizado com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer***P≤ 0,001, comparado o grupo VBJ e os demais grupos tratados N= 6.

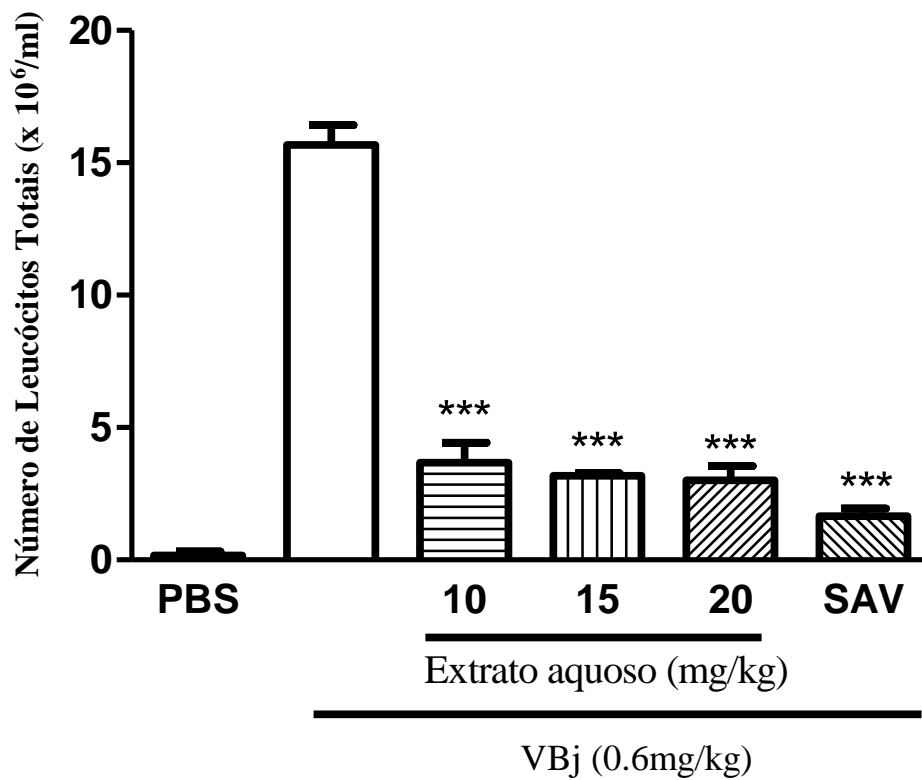


Figura 27 Efeito do extrato aquoso de *H. speciosa* em modelo experimental de inflamação local induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 20, 30 e 40 mg/kg, pela via intravenosa, e 100µL de soro antibiótico (SAV), intraperitonealmente. Cinco minutos depois, receberam, pela via intramuscular, 50µL de VBJ (0.6mg/kg) Após 24 horas, o músculo foi dissecado e homogeneizado com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VBJ e os demais grupos tratados N= 6.

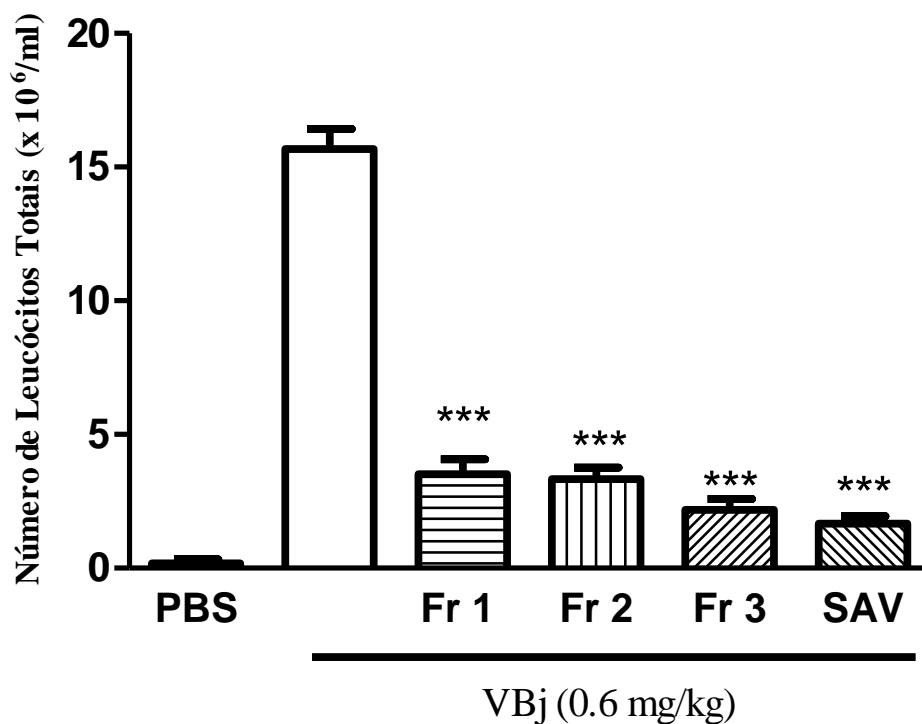


Figura 28 Efeito das frações CH_2Cl_2 , AcOEt, e *n*-BuOH da *H. speciosa* em modelo experimental de inflamação local induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH_2Cl_2 (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μL de soro antibotrópico (SAV), intraperitonealmente. Cinco minutos depois, receberam, pela via intramuscular, 50 μL de VBj (0.6mg/kg). Após 24 horas, o músculo foi dissecado e homogeneizado com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VBj e os demais grupos tratados N= 6.

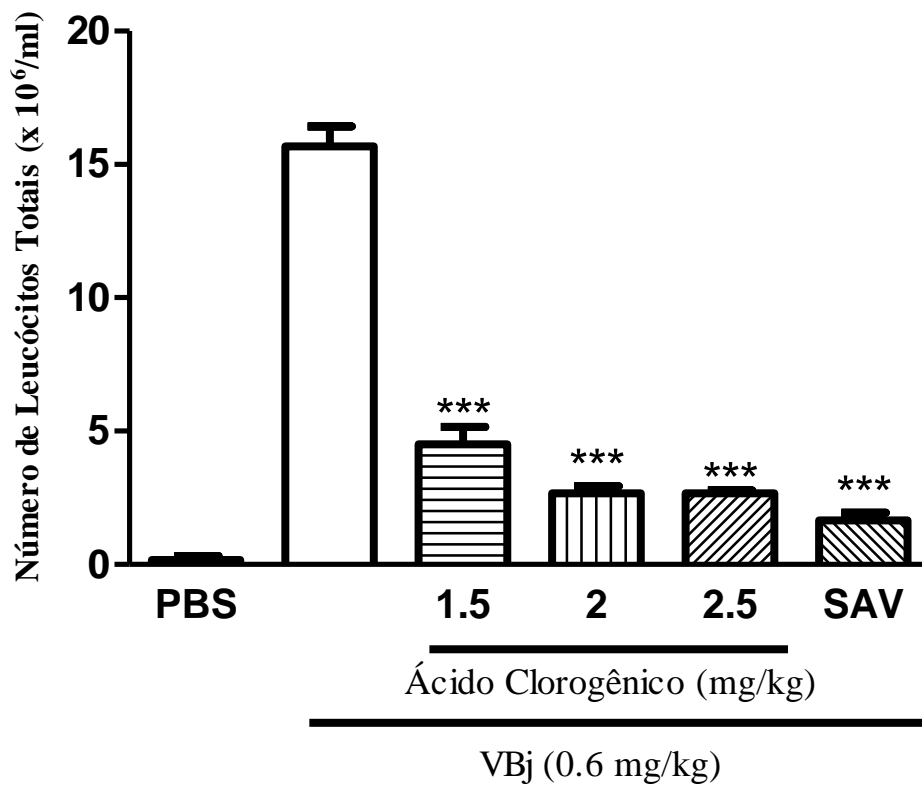


Figura 29 Efeito do Ácido Clorogênico em modelo experimental de inflamação local induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com o ácido clorogênico, nas doses de 1.5, 2 e 2.5 mg/kg, pela via intravenosa, e 100µL de soro antibotrópico (SAV), intraperitonealmente. Cinco minutos depois, receberam, pela via intramuscular, 50µL de VBj (0.6mg/kg). Após 24 horas, o músculo foi dissecado e homogeneizado com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VBj e os demais grupos tratados N= 6.

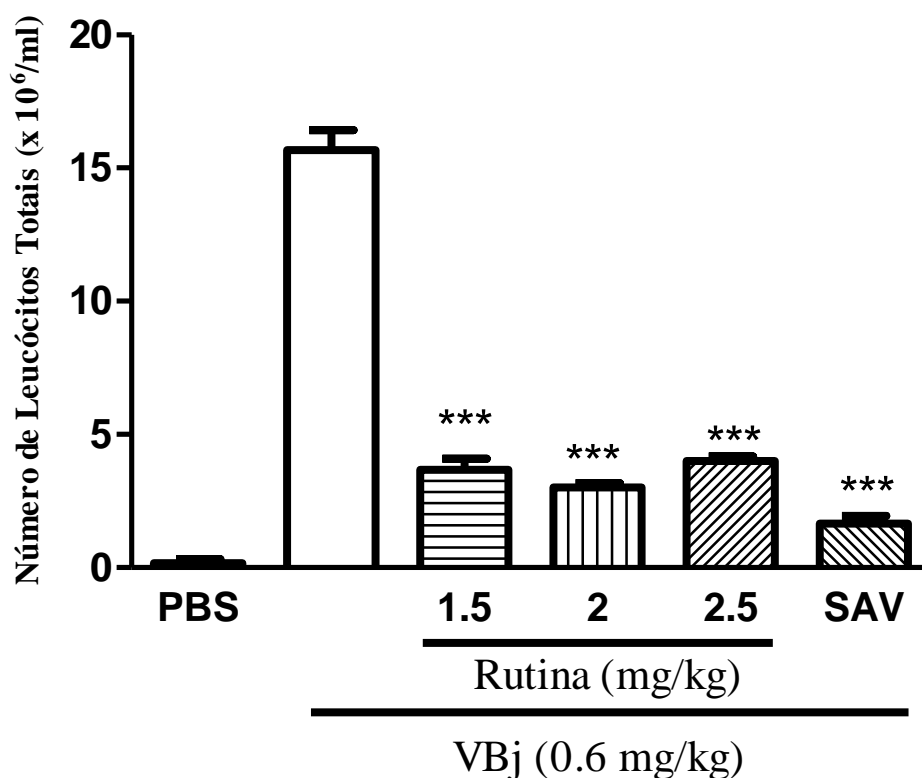


Figura 30 Efeito da Rutina em modelo experimental de inflamação local induzida por peçonha de *B. jararaca*. Camundongos BALB/c foram tratados com rutina, nas doses de 1.5, 2 e 2.5 mg/kg, pela via intravenosa, e 100µL de soro antitoxico (SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intramuscular, 50µL de VBJ (0.6mg/kg). Após 24 horas, o músculo foi dissecado e homogeneizado com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer***P≤ 0,001, comparado o grupo VBJ e os demais grupos tratados N= 6.

5.7 AVALIAÇÃO DO ENVENENAMENTO INDUZIDO POR *T. serrulatus*

O envenenamento induzida por VTs foi avaliado usando um modelo experimental de peritonite. Observou-se um aumento significativo na migração das células para a cavidade peritoneal após a injeção de VTs intraperitonealmente. Dentre as doses testadas, o influxo leucocitário mais intenso foi obtido com 0.8 mg/kg (Figura 31). Esta dose foi escolhida como a dose-desafio para a avaliação da atividade anti-inflamatória induzida por VTs do extrato aquoso e frações de *M. tenuiflora* e extrato aquoso, frações e compostos isolados da *Hancornia speciosa*. Depois de selecionar a dose, avaliou-se a cinética (4, 6 e 8 h) da migração celular peritoneal induzida por VTs. Os resultados apresentados na Figura 32 revelam que a peçonha de *T. serrulatus* induziu

um aumento acentuado na migração celular para a cavidade peritoneal nos três tempos analisados (4, 6 e 8 h). O maior influxo de células foi observado 6 horas após a injeção do VTs, sendo esse tempo selecionado para o ensaio de neutralização, avaliando a capacidade do extrato aquoso e frações de *M. tenuiflora* e extrato aquoso, frações e compostos isolados da *Hancornia speciosa* de inibir a inflamação decorrente do envenenamento induzido por VTs.

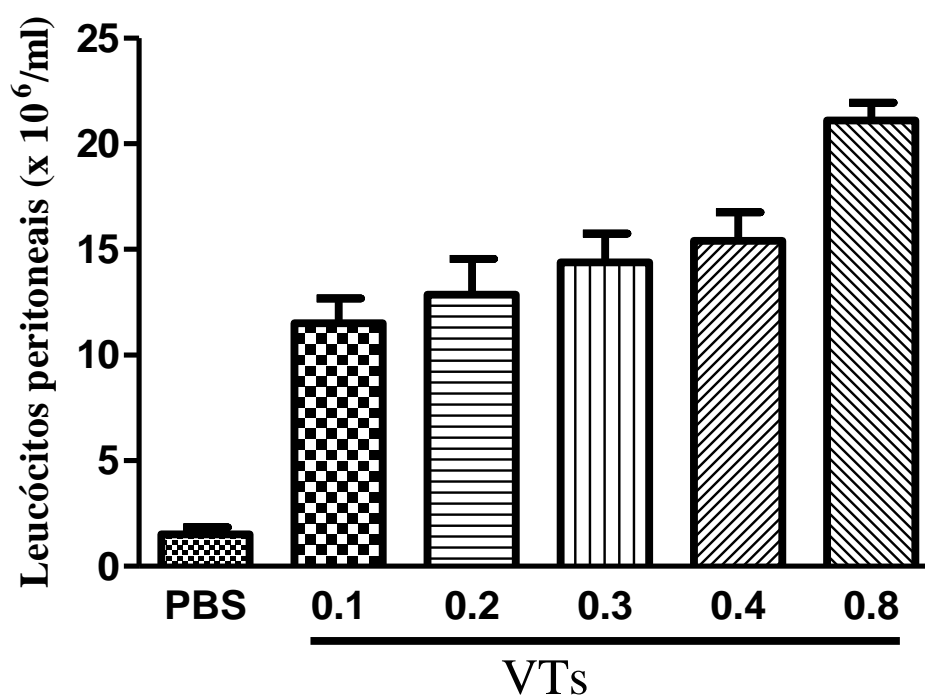


Figura 31 Avaliação do envenenamento induzido por *T. serrulatus*, escolha da dose-desafio. Camundongos BALB/c receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VTs, em diferentes doses (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células foi determinado em câmara de Neubauer N= 6.

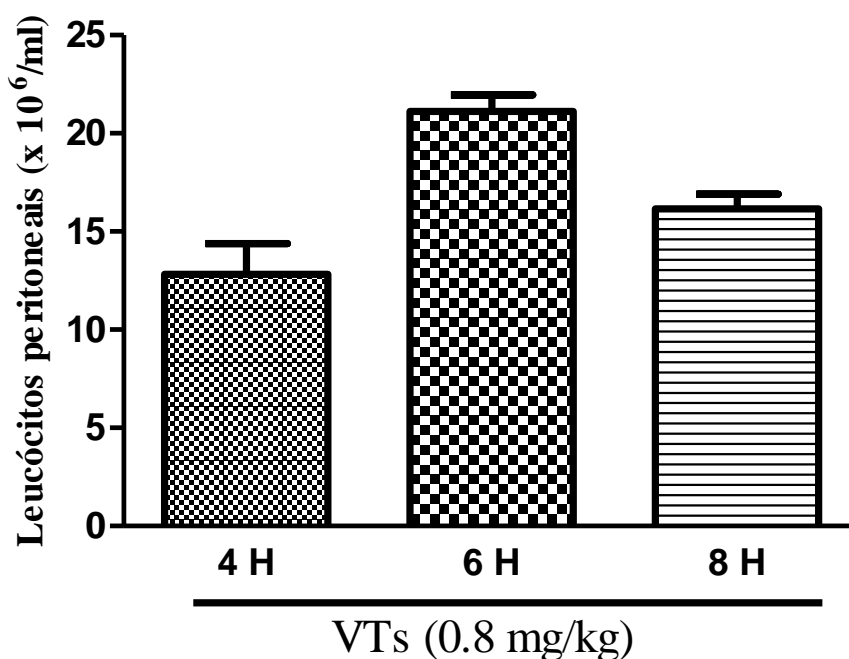


Figura 32 Avaliação da cinética do envenenamento induzido por *T. serrulatus*, escolha do tempo-resposta. Camundongos BALB/c receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VTs (0.8 mg/kg). Após 4, 6 e 8 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células foi determinado em câmara de Neubauer N= 6.

5.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO E FRAÇÕES DA *Mimosa tenuiflora* E EXTRATO AQUOSO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DA *Hancornia speciosa* EM MODELO DE ENVENENAMENTO INDUZIDO POR *Tityus serrulatus*

O envenenamento induzido por VTs induz uma resposta inflamatória intensa. Nesse modelo experimental de envenenamento, foi avaliada a migração leucocitária para a cavidade peritoneal, por meio da contagem global de leucócitos (x10⁶/mL), após a administração da poçonha. Os animais que receberam intravenosamente PBS, cinco minutos depois, foram inoculados com VTs intraperitonealmente, apresentaram intensa migração leucocitária para o peritônio. Por outro lado, observou-se que os grupos tratados com as diferentes doses dos extratos aquosos da *M. tenuiflora* (Figura 33) e da *H. speciosa* (Figura 35) exibiram uma significativa redução da migração celular para a cavidade peritoneal, bem como demonstraram a capacidade de reduzir os níveis de

citocinas pro-inflamatórias IL-6 (Figura 34 (a)), IL-12 (Figura 34 (b)) e IL-1 β (Figura 34 (c)) para a Jurema-Preta; e os níveis de IL-6 (Figura 36 (a)), IL-12 (Figura 36 (b)) e IL-1 β (Figura 36 (c)) para a Mangabeira – quando comparado com o grupo que recebeu apenas VTs.

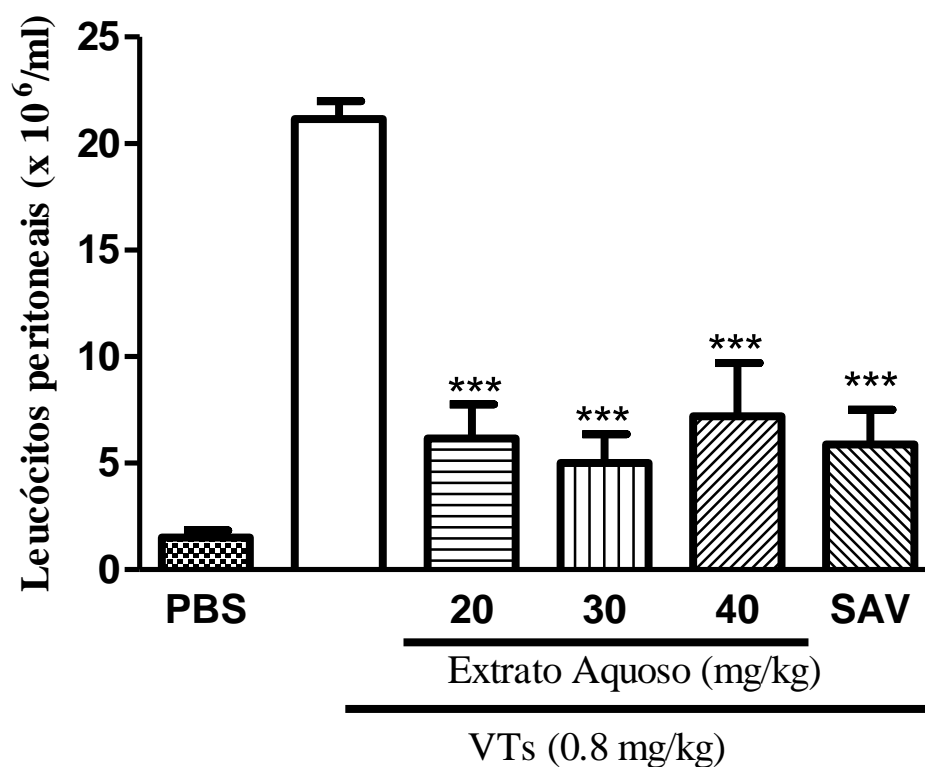


Figura 3331 Efeito do extrato aquoso de *M. tenuiflora* em modelo de envenenamento induzida por peçonha de *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 20, 30 e 40 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μ L de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. ***P \leq 0,001, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados N= 6.

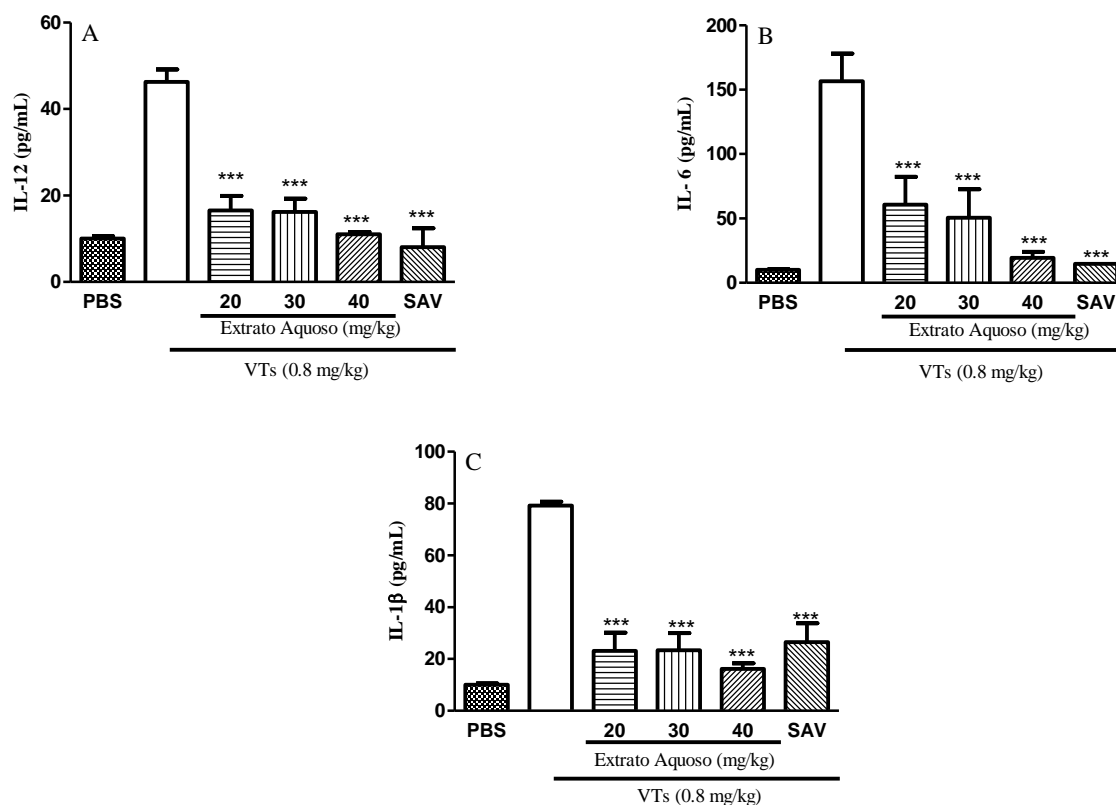


Figura 32 Efeito da administração do extrato aquoso de *M. tenuiflora* sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1 β no modelo de envenenamento induzida por *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 20, 30 e 40 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μ L de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e com o sobrenadante foi realizado a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) por ELISA. ***P \leq 0,001, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados N= 6.

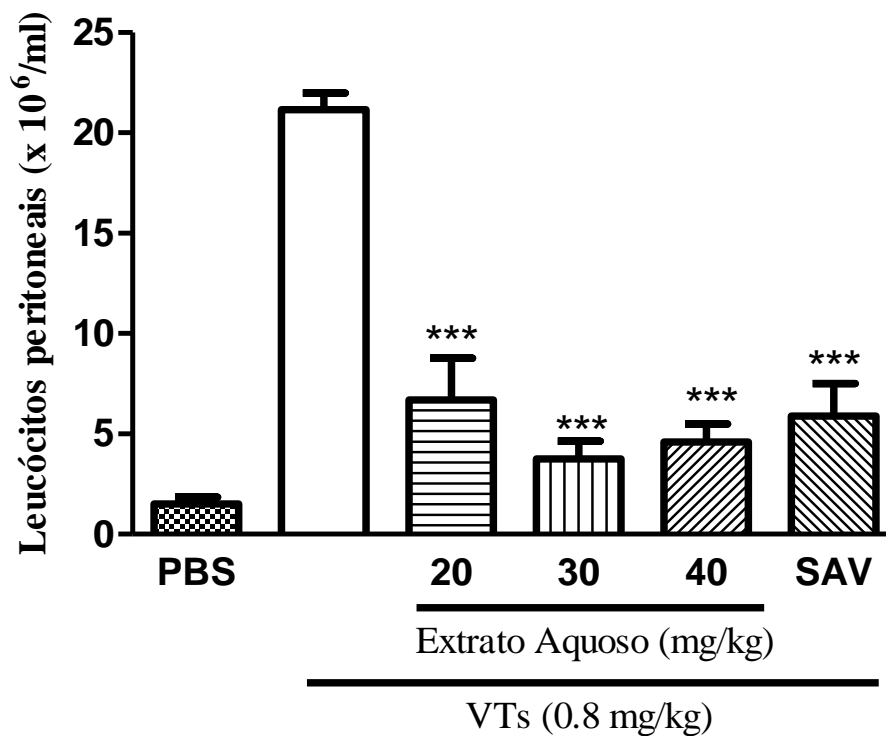


Figura 35 Efeito do extrato aquoso de *H. speciosa* em modelo de envenenamento induzido por *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 20, 30 e 40 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μ L de soro antiaracnídeo(SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados N= 6.

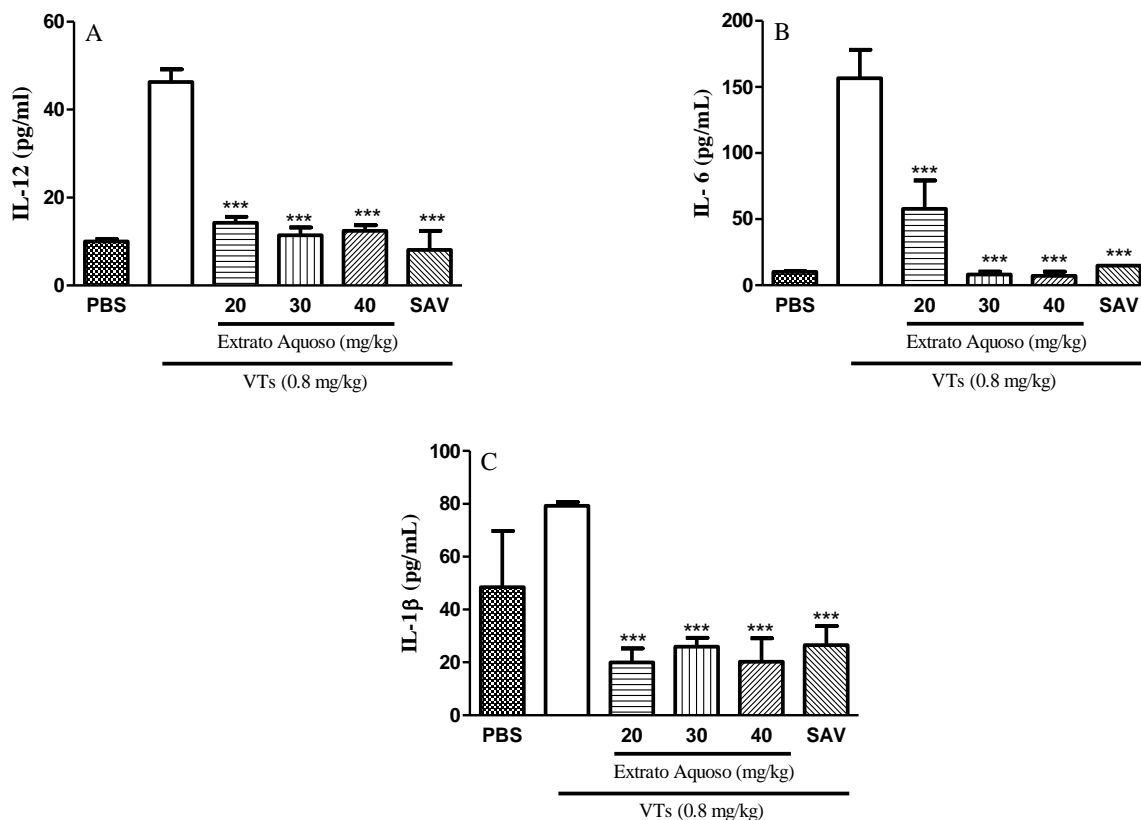


Figura 33 Efeito da administração do extrato aquoso de *H. speciosa* sobre os níveis de IL-12, IL-6, sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1 β no modelo de envenenamento induzido por *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com o extrato aquoso, nas doses de 20, 30 e 40 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μ L de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e com o sobrenadante foi realizada a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) por ELISA. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados N= 6.

Posteriormente, foi avaliada a atividade anti-inflamatória induzida por VTs das frações CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH das plantas em estudo. Todas as frações foram capazes de reduzir o infiltrado inflamatório (Figuras 37 e 39; *M. tenuiflora* e *H. speciosa*, respectivamente) e a produção de citocinas no exudato peritoneal – IL-6 (Figura 38 (a)), IL-12 (Figura 38 (b)) e IL-1 β (Figura 38 (c)) para a *M. tenuiflora*; e IL-6 (Figura 40 (a)), IL-12 (Figura 40 (b)) e IL-1 β (Figura 40 (c)) para a *H. speciosa*.

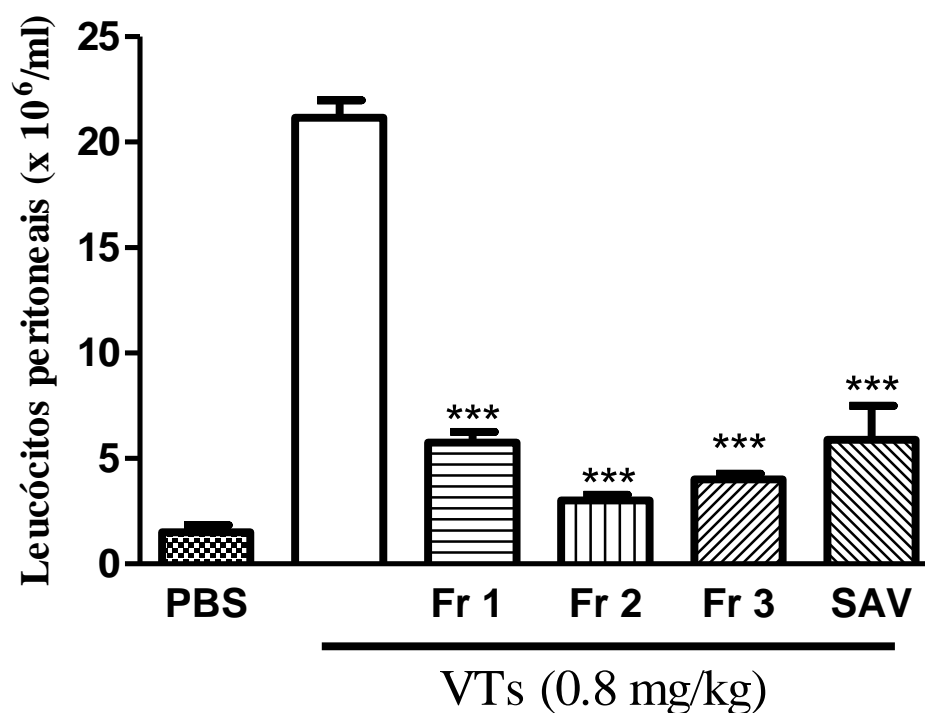


Figura 37 Efeito das frações CH_2Cl_2 , AcOEt, e *n*-BuOH da *M. tenuiflora* em modelo de envenenamento induzido por *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH_2Cl_2 (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μL de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μL de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados $N= 6$.

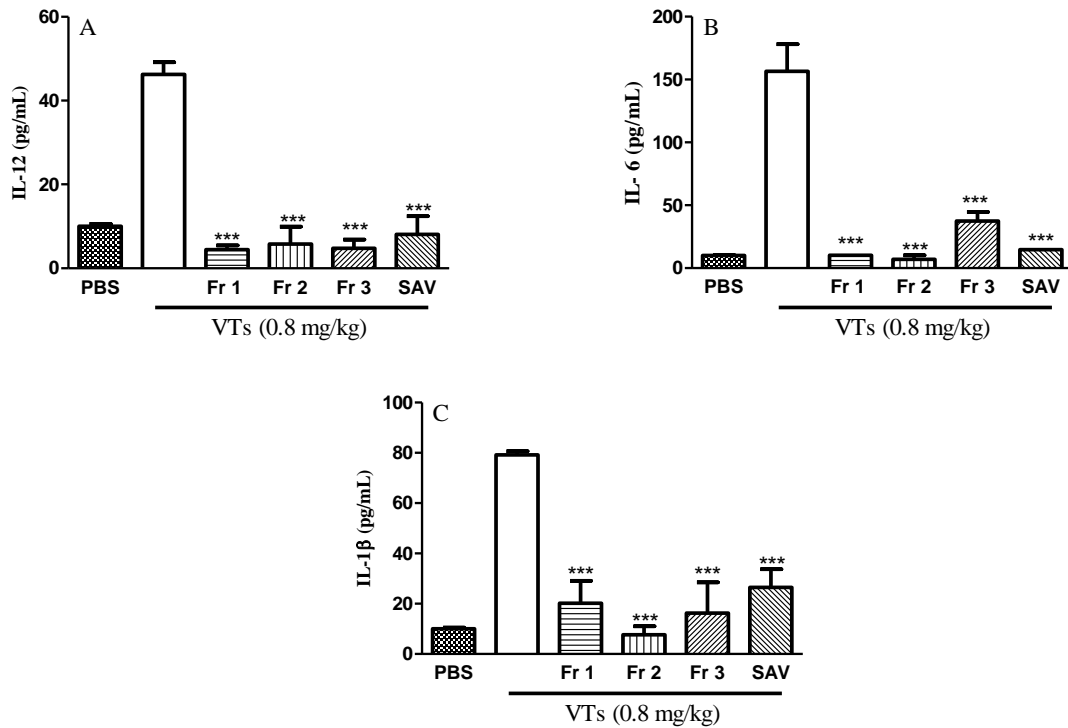


Figura 38 Efeito da administração das frações CH_2Cl_2 , AcOEt, e *n*-BuOH de *M. tenuiflora* sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1 β no modelo de envenenamento induzido por *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH_2Cl_2 (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μL de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μL de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e com o sobrenadante foi realizada a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) por ELISA. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados $N= 6$.

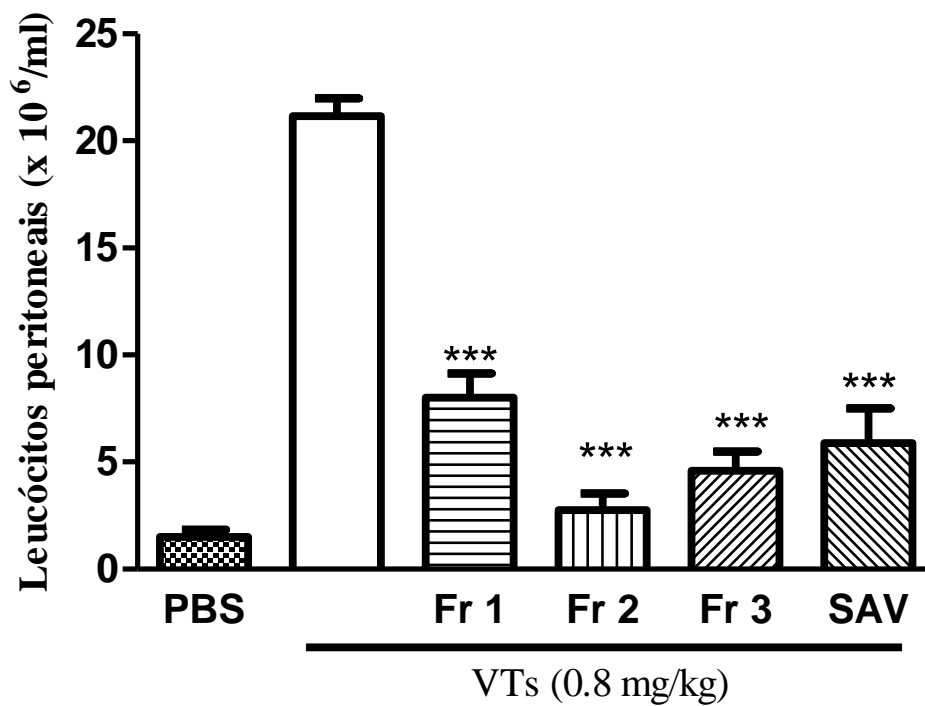


Figura 39 Efeito das frações CH_2Cl_2 , AcOEt, e *n*-BuOH da *H. speciosa* em modelo de envenenamento induzido por *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH_2Cl_2 (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μL de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μL de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados N= 6.

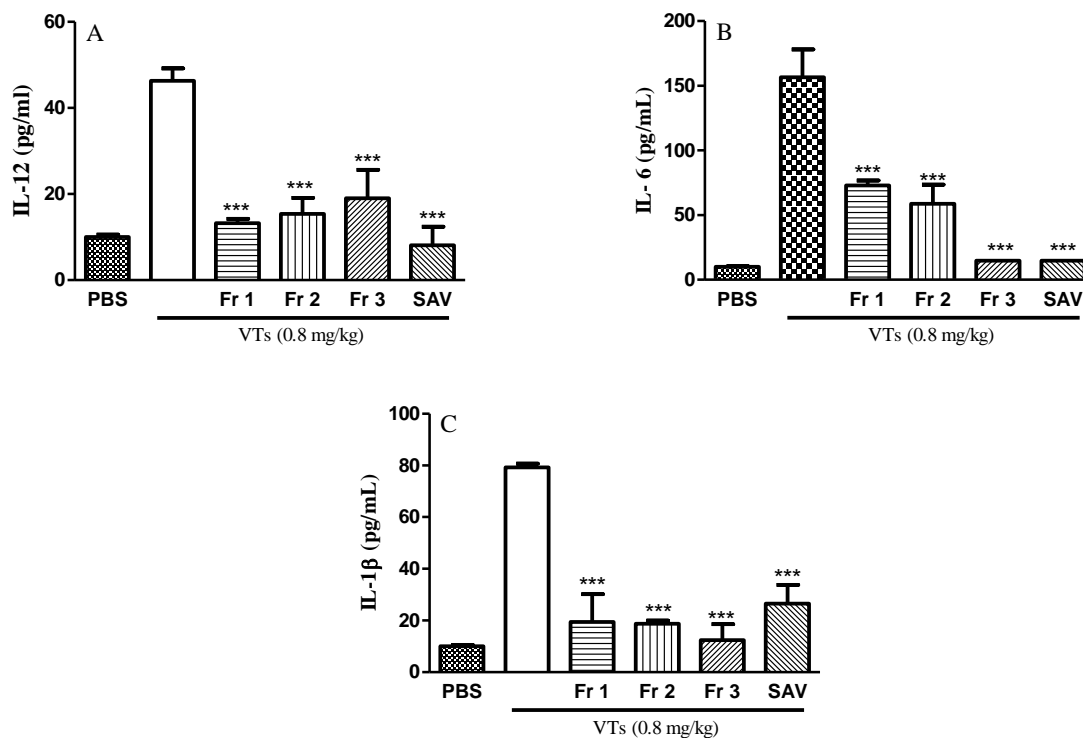


Figura 40 Efeito da administração das frações CH_2Cl_2 , AcOEt, e *n*-BuOH da *H. speciosa* sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1 β no modelo de envenenamento induzido por *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com as frações CH_2Cl_2 (Fr1), AcOEt (Fr 2) e *n*-BuOH (Fr3), na dose de 20 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μL de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μL de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e com o sobrenadante foi realizada a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) por ELISA. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados N= 6.

Por fim, foi avaliada a ação dos compostos isolados, rutina e ácido clorogênico, obtidos do extrato aquoso da *H. speciosa*, frente ao envenenamento promovido por *T. serrulatus*. Foi observado que tanto o ácido clorogênico (Figura 41) quanto a rutina (Figura 43) reduziram o influxo celular para a cavidade peritoneal, assim como também inibiram a produção das citocinas IL-6 (Figura 42 (a)), IL-12 (Figura 42 (b)) e IL-1 β (Figura 42 (c)) para o ác. Clorogênico; e IL-6 (Figura 44 (a)), IL-12 (Figura 44 (b)) e IL-1 β (Figura 44 (c)) para a rutina.

Foi utilizado também o soro antiaracnídeo como controle que é utilizado como tratamento de escolha em casos de acidentes escorpionicos no estado do Rio Grande do Norte. Como tem a capacidade de reverter o quadro clínico do paciente, o soro inibiu, de forma significativa, a migração celular para a cavidade peritoneal, assim como

também reduziu os níveis das citocinas IL-6, IL-12 e IL-1 β no exudato peritoneal dos animais que receberam VTs. Foi confirmado ainda que não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com os extratos brutos e frações da *M. tenuiflora*, frações, rutina e ácido clorogênico da *H. speciosa* e o grupo tratado com o soro; ou seja, todos foram capazes, de maneira semelhante, de diminuir significativamente a migração celular para a cavidade peritoneal daqueles animais que foram envenenados com VTs. Portanto, quando comparado ao grupo controle positivo, que recebeu a peçonha do escorpião *T. serrulatus* no peritônio e PBS intravenoso, o SAV e as plantas *M. tenuiflora* e *H. speciosa* apresentaram a capacidade de reduzir a inflamação ocasionada pelo envenenamento induzido por VTs.

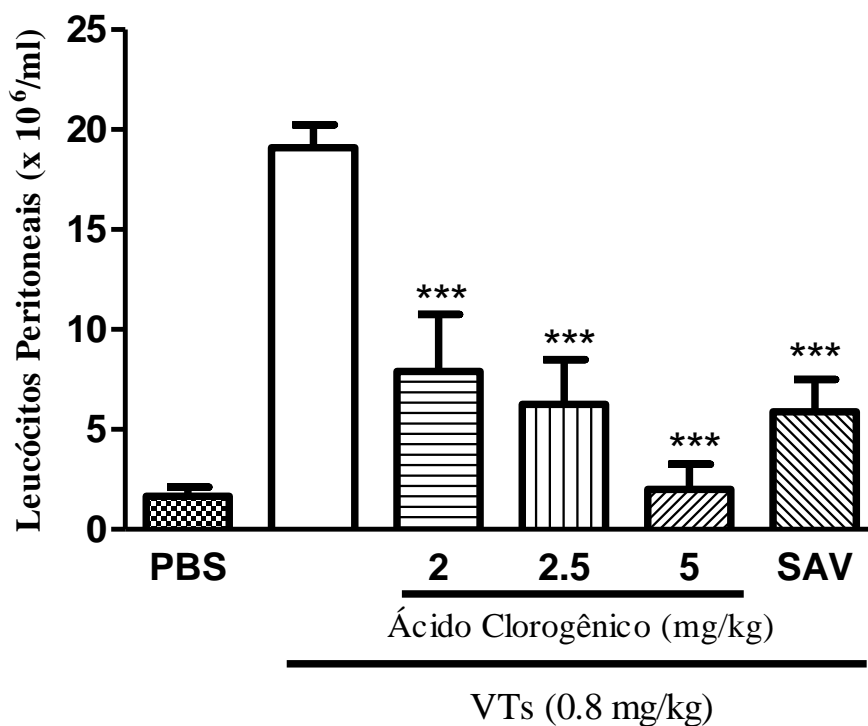


Figura 341 Efeito do Ácido Clorogênico em modelo de envenenamento induzido por *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com o ácido clorogênico, nas doses de 2, 2.5 e 5 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μ L de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. Cinco minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. ***P \leq 0,001, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados N= 6.

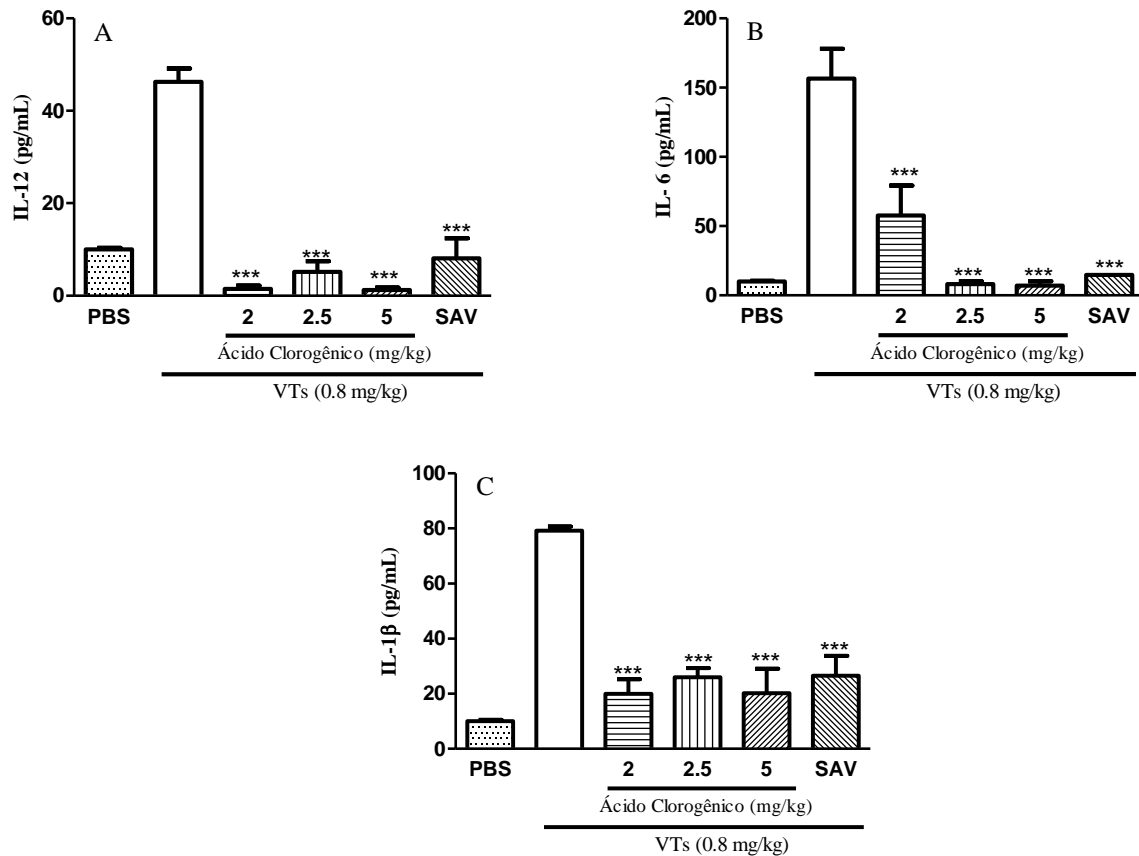


Figura 42 Efeito da administração do **Ácido Clorogênico** sobre os níveis de **IL-12**, **IL-6** e **IL-1β** no modelo de envenenamento induzido *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com o ácido clorogênico, nas doses de 2, 2.5 e 5mg/kg, pela via intravenosa, e 100μL de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. Cinco minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100μL de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e com o sobrenadante foi realizada a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B) e IL-1β (C) por ELISA. ***P≤ 0,001, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados N= 6.

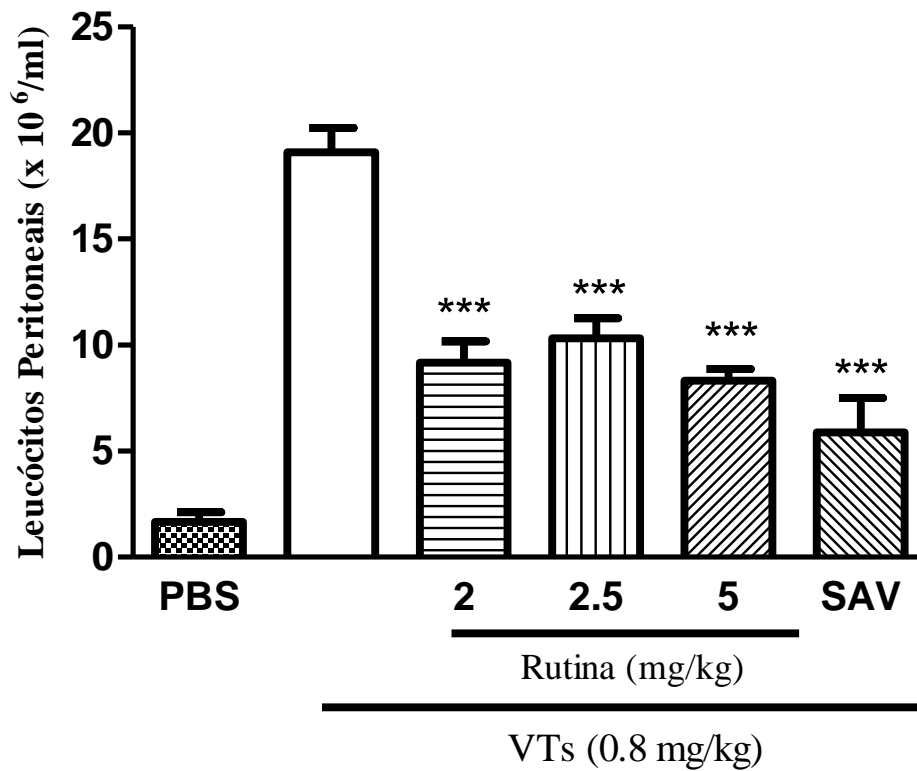


Figura 43 Efeito do Rutina em modelo de envenenamento induzido por *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com a rutina, nas doses de 2, 2.5 e 5 mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μ L de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VTs (0.8 mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e o número de células determinado em câmara de Neubauer. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados N= 6.

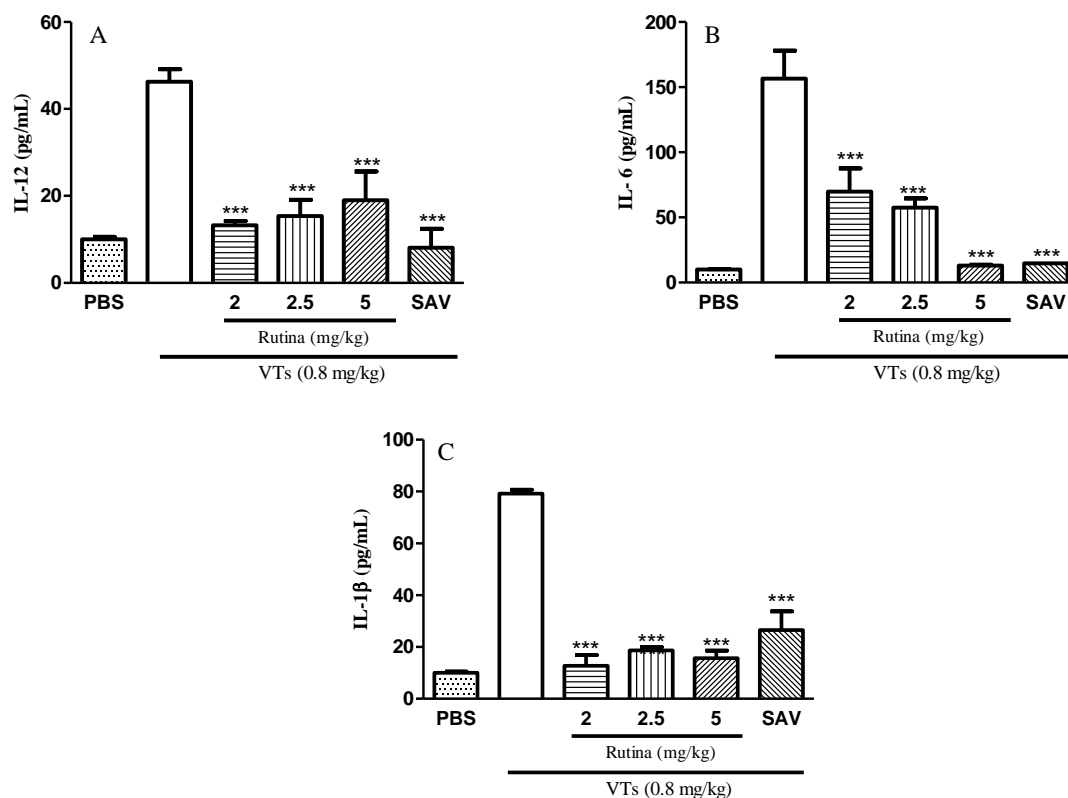


Figura 44 Efeito da administração de Rutina sobre os níveis de IL-12, IL-6 e IL-1 β no modelo de envenenamento induzido por *T. serrulatus*. Camundongos BALB/c foram tratados com a rutina, nas doses de 2, 2.5 e 5mg/kg, pela via intravenosa, e 100 μ L de soro antiaracnídeo (SAV), intraperitonealmente. 5 minutos depois, receberam, pela via intraperitoneal, 100 μ L de VTs (0.8mg/kg). Após 6 horas, foi realizado o lavado peritoneal com PBS gelado, e com o sobrenadante foi realizada a dosagem das citocinas IL-12 (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) por ELISA. *** $P \leq 0,001$, comparado o grupo VTs e os demais grupos tratados N= 6.

6. DISCUSSÃO

A utilização de plantas como medicamento acontece ao longo da história do homem. Por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, algumas plantas adquiriram fundamental importância na medicina popular. A flora brasileira é considerada uma das mais ricas fontes de material com potencial farmacológico e biotecnológico do mundo, devido à diversidade de espécies e aos conhecimentos oriundos da medicina tradicional. É cada vez maior o interesse no estudo de plantas nativas do Brasil que apresentem potencial terapêutico e econômico (DE FÁTIMA et al, 2002).

O uso de plantas para o tratamento de envenenamentos ocasionados por animais peçonhentos tem sido largamente utilizado por populações nativas em todo o mundo. Estes povos utilizam o suco proveniente da maceração destas plantas, aplicando-o sobre o local da picada ou mesmo fazendo ingestão oral. O uso de extratos de plantas para o tratamento de envenenamentos causados por animais peçonhentos, principalmente os acidentes ofídicos, também é comum em regiões onde o acesso à soroterapia é restrito ou nulo. Do conhecimento destes povos, surgiram evidências científicas acerca das propriedades antiofídicas e medicinais dos extratos vegetais. Porém, apenas nos últimos vinte anos o tema tem merecido atenção dos meios científicos (MARTZ, 1992; RIZZINI et al, 1988). Dessa forma, extratos vegetais surgem como uma alternativa no tratamento ofídico/escorpiônico, por conterem uma gama de componentes químicos com diversas propriedades farmacológicas de interesse medicinal (MARIANO et al, 2005).

Considerando a diversidade da flora brasileira e seu potencial farmacológico, como também o aumento no interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos a partir de plantas medicinais, o presente trabalho elucidou, pela primeira vez, a atividade anti-inflamatória dos extratos e frações da *M. tenuiflora* e extratos, frações e compostos isolados (rutina e ácido clorogênico) da *H. speciosa* frente à carragenina e às peçonhas da serpente *B. jararaca* e do escorpião *T. serrulatus*.

Para um melhor entendimento da ação dessas plantas, foi realizada uma análise fitoquímica, que teve como finalidade a elucidação dos compostos bioativos. Para a caracterização do extrato aquoso, foram feitas as análises: triagem fitoquímica, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. Foi

identificada, primeiramente, a presença de compostos fenólicos, flavonóides, taninos, saponinas e alcaloides, por meio de reações de identificação no extrato aquoso da *M. tenuiflora*. Para uma maior fidedignidade dos resultados, foi realizada uma cromatografia em camada delgada, a partir da qual foi identificada a presença de flavonóides e compostos sugestivos para saponina ou terpenos. De acordo com a literatura, esses compostos já foram identificados e isolados do extrato etanólico da *M. tenuiflora* (MECKES-LOZOYA et al., 1990; JIANG et al., 1992; ANTON et al., 1993; RIVERA-ACER et al., 2007; KANG et al., 2005).

A triagem fitoquímica da *H. speciosa* demonstrou, por meio das reações de identificação, a presença de compostos fenólicos, flavonóides, taninos, saponinas e alcaloides. Como essas reações podem apresentar resultados falso positivos, devido a sua baixa especificidade, os extratos foram submetidos à análise por CCD, que demonstrou indicativo da presença dos compostos fenólicos rutina e ácido clorogênico. Para confirmar a presença desses compostos, foi realizada a análise do extrato aquoso por CLAE, confirmando-se, assim, a presença de rutina e ácido clorogênico – sendo este último o composto majoritário do extrato bruto. De acordo com Andrade (2002), o ácido clorogênico foi identificado no extrato das cascas; e Ferreira (et al., 2007) isolou a rutina do extrato das folhas da *H. speciosa*. Porém, essa é primeira vez que são identificados tais compostos bioativos no fruto da *H. speciosa*. Conhecendo, então, o perfil fitoquímico das plantas em estudo, o próximo passo foi avaliar as atividades biológicas em diversos modelos experimentais *in vivo*.

O sistema imunológico desempenha um papel primordial na resposta do organismo à ação da peçonha, caracterizando-se como uma resposta de defesa ao agente agressor. Pode-se observar que, após um envenenamento por serpentes ou escorpiões, há o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada, agravando, assim, o quadro clínico do paciente (DALE; FOREMAN, 1994; MOSS et al., 1973; CUSINATO, 2010). Como a inflamação está intimamente ligada a acidentes ofídicos e escorpiônicos, foi sugerido neste trabalho a hipótese de que as plantas que demonstrassem atividade anti-inflamatória seriam fortes candidatas ao desenvolvimento de novos fármacos que apresentassem a capacidade de reverter os danos causados pelas peçonhas desses animais. Portanto, foi avaliada a capacidade da *M. tenuiflora* e da *H. speciosa* de inibir o processo inflamatório induzido pela carragenina – um inflamógeno amplamente utilizado em modelos experimentais de inflamação.

A peritonite induzida pela carragenina é um modelo de inflamação aguda comumente utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória de fármacos (IMPELLIZZERI, 2008) e avaliar a contribuição de diversos tipos celulares e mediadores imunológicos para o desencadeamento da inflamação (TOMLINSON, 1994). O processo inflamatório é invariavelmente caracterizado pela produção de prostaglandinas, leucotrienos, histamina, bradicinina, fator de ativação plaquetária e as interleucinas (IL) (RIBEIRO, 2014). O recrutamento de células polimorfonucleares (PMNs), a partir da circulação para o tecido inflamado, tem uma função chave na degradação do tecido lesionado (BARBOSA, 2013; DALMARCO, 2008).

A administração intraperitoneal de carragenina produz um aumento da permeabilidade capilar das vênulas próximas ao local da inflamação, levando, assim, a um intenso influxo leucocitário – particularmente, de neutrófilos (MALECH, 1987). O processo de recrutamento de leucócitos para locais de inflamação é reforçado por uma série de mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-8 e aminas vasoativas, ICAM e VCAM, que são produzidos e liberados para o tecido por mastócitos, macrófagos e células ativadas do endotélio vascular (DALMARCO, 2008).

Este estudo avaliou o efeito anti-inflamatório *in vivo* do extrato e frações de *M. tenuiflora* e extrato aquoso, frações e os compostos isolados, rutina e ácido clorogênico, da *H. speciosa* nesse modelo experimental. Os animais tratados intravenosamente com PBS, e, 30 min mais tarde, por via intraperitoneal, com carragenina, confirmaram intensa migração de leucócitos para a cavidade peritoneal. Por outro lado, os grupos tratados com os extratos, frações e compostos isolados das plantas em estudo e a dexametasona, mostraram uma inibição significativa da migração das células para a cavidade peritoneal, bem como uma redução nos níveis de IL-6, IL-12, TNF α e IL-1 β no exudato peritoneal.

O mecanismo de ação utilizado pela *M. tenuiflora* e pela *H. speciosa* neste modelo de inflamação ainda é desconhecido. No entanto, sugere-se que pode ser devido à ligação dos componentes ativos dessas plantas com os receptores do endotélio vascular, evitando, assim, os rolamentos de leucócitos para dentro da cavidade peritoneal, assim como também inibindo a produção de citocinas responsáveis pelo desencadeamento do processo inflamatório (BITENCOURT, 2011; KELLY, 2008; KRIEGER, 1994).

Foi observado também que não houve diferença estatística entre os grupos tratados com a *M. tenuiflora* e *H. speciosa* e a dexametasona (corticosteróide

amplamente utilizado na medicina), o que pode sugerir que as plantas em estudo podem apresentar um mecanismo de ação semelhante ao medicamento comercialmente utilizado. Sabe-se que a dexametasona apresenta atividade anti-inflamatória comprovada; seu mecanismo de ação baseia-se nos efeitos inibitórios sobre a síntese de prostaglandinas. Esse efeito também é medido pela síntese de proteínas, tendo em vista que os corticosteróides induzem à síntese de transcortina e macrocortina – proteínas que inibem a síntese de prostaglandinas através da inibição da fosfolipase A2, responsável pela hidrólise do ácido araquidônico da membrana celular, para produção de prostaglandinas, tromboxanos. É um medicamento amplamente utilizado em casos de doenças auto-imunes, como lúpus e psoríase, devido sua atividade imunossupressora (LUSTER et al., 2005). No entanto, esse fármaco apresenta sérios efeitos colaterais para seus usuários. Atualmente, vários estudos são dedicados à pesquisa de produtos naturais em modelos de inflamação, os quais vêm apresentando resultados inovadores, demonstrando o potencial anti-inflamatório de substâncias extraídas de produtos naturais (AL-SAGHIR et al., 2009; SAKLANI; KUTTY, 2008; SOUZA et al., 2008, 2009).

A reação inflamatória é um componente importante dos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*. Neste estudo, foram investigadas as alterações sistêmicas e locais induzidas pela peçonha da *Bothrops jararaca*.

Diversos estudos demonstram que os envenenamentos ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops* induzem uma intensa resposta inflamatória no local da picada, com uma acumulação significativa de leucócitos no sítio da inflamação (FLORES et al., 1993; ACOSTA et al., 1996; FARSKY et al., 1997). Os mecanismos envolvidos neste evento não foram totalmente elucidados; porém, percebe-se que o acúmulo de leucócitos no tecido inflamado é resultado da geração de fatores quimiotáticos, bem como de interações entre leucócitos e células endoteliais da microcirculação (KONSTANTOPOULOS, 1997).

Sabe-se também que a inflamação induzida por VBj resulta em aumento da expressão de moléculas de adesão, aumentando a interação entre os leucócitos circulantes e as células endoteliais. Zamuner (2002) demonstrou que o influxo de neutrófilos induzido pela injeção de VBj em camundongos está relacionado com a expressão de LECAM-1, LFA-1, ICAM-1, PECAM-1 – que são moléculas de adesão –; e está relacionado também com os eventos responsáveis pelo rolamento, adesão e

transmigração dos neutrófilos para o local da picada. Isto indica que a peçonha é capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais.

O efeito do extrato aquoso e da *M. tenuiflora* foi avaliado em um *B. jararaca* modelo de envenenamento induzido pela administração da peçonha. Os grupos tratados com *M. tenuiflora* apresentaram uma significativa inibição da migração celular para a cavidade peritoneal, provavelmente devido à capacidade dos componentes do extrato em inibir a liberação de mediadores da inflamação, impedindo a migração leucocitária. Estudos demonstraram a presença de polifenóis e saponinas no extrato da *M. tenuiflora*. Sabe-se que esses compostos apresentam atividade anti-inflamatória, e alguns polifenóis apresentam ação antioxidante (JIANG et al., 1992; ANTON et al., 1993; RIVERA-ACER et al., 2007; KANG et al., 2005). Essas atividades são de extrema importância para debelar um processo inflamatório já instalado.

Já no local da inflamação, os leucócitos são ativados e realizam fagocitose da peçonha. Nessa fase, uma série de eventos de sinalização induzem os macrófagos a expressarem genes pró-inflamatórios, como o óxido nítrico sintetase (iNOS) (HENDRA et al., 2011). Outra via metabólica importante é a explosão respiratória no fagolisossomo dos macrófagos ativados. Esse evento é caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio e consequente geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion superóxido (O_2^-). Pesquisas relataram o envolvimento desses processos durante o envenenamento, como a liberação de H_2O_2 e de NO por células peritoneais 48 horas após a inoculação de VBj (ZAMUNER et al., 2001).

Nesse trabalho, foi estudada a capacidade dos extratos, frações e rutina e ácido clorogênico isolados da *H. speciosa* de debelar o processo inflamatório induzido por VBj. Foi confirmado que todos os grupos tratados apresentaram a capacidade de inibir, de forma eficaz, a inflamação decorrente do envenenamento. Observou-se que tanto o extrato bruto como os compostos isolados apresentaram atividade biológica semelhante. Portanto, é possível sugerir que esses compostos estão atuando em sinergismo, contribuindo, assim, para maximizar a atividade farmacológica da *H. speciosa*. Portanto, tanto a atividade anti-inflamatória do ácido clorogênico (SHIN et al., 2015), como a atividade antioxidante da rutina (HEDRA et al., 2011; AZEVEDO et al., 2013), podem estar impedindo a formação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que estão envolvidas no desencadeamento do envenenamento – com consequente diminuição do estresse oxidativo, derivado da liberação de radicais livres pelos

macrófagos ativados, como também a redução dos mediadores inflamatórios, com consequente inibição da migração leucocitária para o local de injeção da peçonha (HEDRA et al., 2011; AZEVEDO et al., 2013; NAKAYAMA et al., 2011).

A inflamação parece desempenhar um papel importante no dano muscular local induzido pela peçonha de *Bothrops jararaca*, uma vez que o uso de uma droga com atividade anti-inflamatória pode proteger o tecido muscular do seu efeito miotóxico (REIS, 2014).

Após o envenenamento por *B. jararaca*, a peçonha provoca alterações patológicas locais, tais como hemorragia, bolhas, necrose e edema, bem como efeitos sistêmicos, caracterizados por hemorragia, coagulopatia, insuficiência renal aguda e distúrbios hemodinâmicos (CARDOSO et al., 1993). Esta inflamação local induzida após a administração intramuscular de VBj é caracterizada por edema (TREBIEN; CALIXTO, 1989), dor (TEIXEIRA et al., 1994) e um infiltrado celular visível (FARSKY et al., 1997). Muitos mediadores inflamatórios estão associados ao incremento da permeabilidade microvascular, hiperalgesia e quimiotaxia de leucócitos. Esta peçonha contém potentes metaloproteases hemorrágicas (TEIXEIRA et al., 2005), que são responsáveis por sangramento local, mionecrose e inflamação (COSTA et al., 2002). Adicionalmente, essas metaloproteases são capazes de induzir hemorragia sistêmica (ESCALANTE et al., 2003).

Nesse estudo, observou-se que, após 24 horas da administração da peçonha de *B. jararaca*, houve uma intensa inflamação no coxim direito do camundongo, com significativo aumento do peso da perna do animal – caracterizando, assim, formação de edema. Também ocorreu migração leucocitária para o músculo gastrocnêmio, onde foi aplicado VBj. Como já relatado anteriormente, os extratos aquosos, frações (diclorometano, acetato de etila e butanólica), como também os compostos isolados rutina e ácido clorogênico da *H. speciosa*, inibiram, de forma satisfatória, a inflamação local induzida por VBj – provavelmente, a atividade anti-inflamatória anteriormente descrita para essa planta seja um indicativo do mecanismo de ação das mesmas nesse modelo experimental.

Os extratos e frações da *M. tenuiflora* reduziram, de forma satisfatória, a inflamação e o dano local ocasionado pela peçonha de *B. jararaca*. Algumas hipóteses podem ser sugeridas. A primeira seria a atividade anti-inflamatória da *M. tenuiflora*, pois, como mostrado anteriormente, essa planta tem a capacidade de inibir a migração leucocitária, como também suprime a produção de citocinas pro-inflamatórias no local

da inflamação. Outra hipótese sugerida seria a atividade cicatrizante do extrato da *M. tenuiflora*; estudos reportam que os altos teores de saponinas (JIANG et al., 1991) e taninos no extrato das cascas são responsáveis pelos potenciais efeitos de cicatrização de feridas (MECKES-LOZOYA et al., 1990), devido a capacidade de induzir a proliferação de fibroblastos humanos em cultura de células – capacidade essa que é imunomoduladora (JIANG et al., 1992; ANTON et al., 1993) e uma ação anti-inflamatória (VILLARREAL et al., 1991).

Os extratos e derivados das plantas *M. tenuiflora* e *H. speciosa* revelaram a capacidade de reduzir o processo inflamatório local. Quando comparado com o grupo tratado com o soro antibotrópico, as plantas apresentaram atividade semelhante, podendo sugerir que as plantas apresentem atividade antiveneno.

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para os acidentes ofídicos é a administração endovenosa de soro antiofídico, de acordo com a gravidade do envenenamento. Apesar de a soroterapia reverter, com bastante eficácia, os efeitos sistêmicos do veneno no organismo da vítima, conseguindo evitar, por muitas vezes, o óbito, ela apresenta algumas desvantagens, como uma série de efeitos colaterais na vítima (reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro), ineficiência no combate aos efeitos locais da peçonha (aumentando as chances de deixar sequelas no membro atingindo) e a necessidade de cuidados com a estocagem do soro e com o prazo de validade (CARDOSO et al., 2003). Além disso, existem inconvenientes para essa terapia, como a indisponibilidade do soro para algumas regiões do país e sua ineficiência em neutralizar alguns efeitos tóxicos em alguns casos de envenenamento (WEN, 2003; DA SILVA et al., 2009).

Portanto, torna-se importante a busca por novos tratamentos, que possam complementar e/ou ser uma alternativa à atual soroterapia para neutralização dos efeitos biológicos e toxicológicos do veneno nas vítimas de acidentes com serpentes peçonhentas.

Em estudo realizado por Gonçalves (2000), foi proposto que a formação do edema após a injeção de VBj se daria por meio de uma resposta inflamatória neurogênica, demonstrando que animais pré-tratados com capsaicina e posteriormente tratados com morfina apresentaram significativa redução do edema induzido por *B. jararaca*. Como descrito nos nossos resultados, os animais que receberam VBj apresentaram um aumento significativo no peso das pernas, caracterizando formação de edema devido ao extravasamento de líquidos – supostamente pelo mecanismo citado

acima. O extrato aquoso da *M. tenuiflora* apresentou, em todas as doses testadas, uma redução quase que completa do edema formado no músculo do animal. O mesmo fato não foi observado com relação ao extrato aquoso da *H. speciosa*, no qual se observou, apenas em doses mais elevadas, uma atividade antiflogística mais evidente. Um fato interessante, observado na *H. speciosa*, foi que, à medida que fracionou-se o extrato bruto e isolou-se os compostos bioativos, a atividade antiedematogênica se apresentou mais eficiente – o que pode sugerir que os compostos isolados (rutina e ácido clorogênico) atuam de forma efetiva na atividade biológica do extrato. O mesmo fato não foi observado na *M. tenuiflora*, pois tanto os extratos quanto as frações apresentaram atividade antiflogística satisfatória, sem diferença estatística entre todos os grupos analisados.

Em estudo realizado em paralelo no nosso laboratório, foi avaliada a atividade antiflogística da *H. speciosa* e da *M. tenuiflora* em modelo experimental de edema de orelha induzido por xilol. Nesse experimento, foi observado que tanto os extratos brutos da jurema-preta e mangaba, como também a rutina e o ácido clorogênico, apresentaram uma redução significativa do edema, comprovando, assim, a atividade antiflogística dessas plantas. O xilol, assim como o VBj, induz a formação do edema por meio de uma inflamação neurogênica (dados não mostrados).

De maneira geral, a resposta inflamatória neurogênica tem como característica fisiológica a vascularização tecidual, o aumento da permeabilidade vascular, que causa o extravasamento de líquido rico em proteínas plasmáticas, incluindo imunoglobulinas, fatores de coagulação e as células nos tecidos lesados com subsequente edema no local (OKOLI et al., 2008). A inflamação induzida pelo xilol/VBj desencadeia mecanismos celulares envolvidos na liberação de substâncias bioativas a partir das terminações periféricas de neurônios sensoriais, que agem sobre células-alvos periféricas (tais como mastócitos e outras células do sistema imune) e células da musculatura lisa vascular, produzindo uma resposta inflamatória do tipo neurogênica, caracterizada por calor, rubor, edema e hipersensibilidade. Esta inflamação é iniciada pela ação de mediadores, tais como acetilcolina, bradicinina, prostaglandinas e capsaicina. Estes mediadores promovem a excitação dos neurônios, levando à liberação direta dos neuropeptídeos e à ativação dos seus receptores, incluindo VR1, B2 e PAR – as quais são promovidas, respectivamente, por influxo de cálcio, ativação da proteína quinase C ou desinibição do fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) (RICHARDSON; VASKO, 2002). A capsaicina é um mediador cujo mecanismo está relacionado aos canais vanilóides, sendo responsável

pela despolarização e pela liberação direta de neuropeptídeos, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) – os principais iniciadores desse tipo de inflamação.

Uma hipótese para o mecanismo de ação dessas plantas é que as mesmas podem estar atuando nos canais da dor, como os vanilóides e/ou opióides, que são responsáveis pela liberação de substância P – neurotransmissor envolvido diretamente com o desenvolvimento do edema.

O próximo passo foi avaliar o efeito antiveneno do extrato e frações de *M. tenuiflora* e extrato aquoso, frações e os compostos isolados, rutina e ácido clorogênico, da *H. speciosa* sobre a inflamação causada durante o envenenamento induzido pelo *T. serrulatus*. A peçonha desse escorpião consiste de uma mistura de neurotoxinas que interagem com canais de Na^+ , K^+ , Ca^+ e Cl^- . As toxinas que agem sobre os canais de íons dependentes de voltagem desempenham um papel importante na resposta imunitária, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios (PETRICEVICH, 2010). No que tange aos envenenamentos graves, induzidos por VTs em camundongos, foi observada a elevação nos níveis séricos de várias citocinas nas primeiras fases da resposta inflamatória aguda, em que os neutrófilos foram as células do sangue predominantes – o aumento nos números séricos de leucócitos é comumente encontrado em casos de escorpionismo (MEKI, 1998; PESSINI, 2003).

O recrutamento de neutrófilos durante um caso de envenenamento escorpiônico se dá devido à ação das catecolaminas, que são liberadas na peçonha do escorpião e induzem à leucocitose através da mobilização dessas células do tecido adjacente (D'AVILA, 2002). Também é provável que os efeitos de estimulação hematopoiéticos de IL-1 e IL-6 desempenhem esse papel (PESSINI, 2003), como também o fator de ativação plaquetária (PAF) (BORGES et al., 2000). As citocinas pró-inflamatórias induzem a manifestações inflamatórias locais e sistêmicas. Os efeitos locais incluem a ativação do endotélio e o aumento da permeabilidade vascular, com migração de leucócitos para o tecido afetado (PETRICEVICH, 2005). Verificou-se que a injeção intraperitoneal de VTs foi capaz de induzir uma reação inflamatória intensa, o que é revelado por níveis elevados de IL-1 β , IL-6 e IL-12 e aumento da migração de células para a cavidade peritoneal. No presente estudo, foi demonstrado que os grupos tratados com o extrato aquoso e frações de *M. tenuiflora* e extrato aquoso, frações e compostos isolados da *H. speciosa* exibiram uma significativa inibição da migração das células para a cavidade peritoneal, e também uma redução nos níveis de IL-6, IL-12 e IL-1 β .

Os grupos tratados com as plantas estudadas, portanto, exibiram atividade anti-inflamatória induzida pelo veneno.

Ainda não existem estudos na literatura que comprovem as atividades antipeçonhentas dos extratos de *M. tenuiflora*; no entanto, sabe-se que existe uma presença significativa de saponinas nesta espécie (JIANG et al., 1991; RIVERA-ARCE et al., 2007). Já a *H. speciosa* é rica em flavonóides e ácidos fenólicos (RODRIGUES et al., 2006; RODRIGUES, 2007). Uma hipótese para esta atividade é a inibição da produção de leucotrienos e prostaglandina E2 através da inibição das enzimas fosfolipase A2 e COX2, respectivamente, bem como o bloqueio da libertação de todos os outros mediadores inflamatórios envolvidos no envenenamento. De acordo com Marinho (et al., 2011), o látex obtido da *H. speciosa* foi capaz de inibir a produção de alguns dos mediadores inflamatórios citados anteriormente (COX2 e PGE2). Tendo em vista os resultados demonstrados anteriormente, extratos de *M. tenuiflora* e *H. speciosa* apresentaram satisfatória ação anti-inflamatória em modelos experimentais de inflamação usando carragenina.

Em relação à inflamação induzida por envenenamento, como estudado no presente trabalho, sabe-se que os venenos de escorpião podem estimular o eixo imune-neuroendócrinos, induzindo a liberação de catecolaminas, corticosteróides, bradicinina (SOFER, 1996; LIMA et al., 2014; MAGALHÃES, 1999; CHAUDRY et al., 1989) e eicosanóides mediadores – como prostaglandina (PG) E2, lipoxina A2 (LXA2) e leucotrieno (LT) B4 (NASCIMENTO et al., 2005; TEXEIRA et al., 1997), que são derivados a partir da oxigenação enzimática do ácido araquidônico (AA). Estas moléculas controlam a sinalização dos processos celulares chave do processo inflamatório, incluindo a ativação, a migração e a proliferação celular (FUNK, 2001; YAQOOB, 2003). Outros estudos na literatura já demonstraram que a PGE2 está envolvido na resposta inflamatória e no recrutamento de neutrófilos (FRUSCELLA, 2001) em camundongos inoculados com o veneno de escorpião *T. serrulatus* (PESSINE et al., 2006); do mesmo modo que certas toxinas de canais de sódio e de potássio (Ts2 e TS6) estão envolvidas na libertação de citocinas e na migração das células através da indução da produção e liberação de PGE2 e LTB4 (ZOCCAL et al., 2013).

Como já foi citado, o extrato aquoso de *M. tenuiflora* é rico em saponinas e taninos (RIVERA-ARCE et al., 2007). Alguns estudos mostraram a presença de flavonóides e saponinas em extratos vegetais que apresentam atividade anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro*. Por exemplo, algumas saponinas e flavonóides demonstraram a

capacidade de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos ativado em cultura celular (KANG et al., 2005; AHN et al., 2005; LEE et al., 2005; XAGORARI et al., 2001). Alguns estudos têm demonstrado que o mecanismo de ação de saponinas e flavonóides, como a rutina, com atividade anti-inflamatória, pode ser mediado através da inibição da ativação do fator nuclear-kB, resultando em diminuição da expressão das proteínas reguladas por NF-kB – tais como o óxido nítrico sintase (iNOS) (HARIDAS et al., 2001; YOU et al., 2001; RUIZ et al., 2007). Em estudo realizado por Shin (et al., 2015), foi observado que o ácido clorogênico apresentou atividade anti-inflamatória, inibindo a produção de TNF α e IL-1 β (citocinas primordiais para o desencadeamento do processo inflamatório) e também a formação de H₂O₂, que encontra-se intimamente ligada ao estresse oxidativo. Não se pode afirmar que o ácido clorogênico e a rutina são os responsáveis pela atividade biológica da *H. speciosa*, já que não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com o extrato bruto, frações e isolado; porém, é possível sugerir que esses compostos atuam em sinergismo, buscando garantir a atividade farmacológica da planta.

Outros estudos revelaram que os taninos têm a capacidade de ligar-se a proteínas (FRAZIER et al., 2003; HAGERMAN, 1981), sugerindo que esses poderiam inativar toxinas da peçonha, impedindo a sua atividade tóxica. Como o envenenamento por *Tityus serrulatus* desencadeia uma resposta inflamatória intensa, é possível que o potencial anti-inflamatório dos componentes ativos da *M. tenuiflora* possa contribuir para a atividade anti-inflamatória induzida pelo veneno, da planta.

7. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

- 1 – Foi possível identificar, por meio de CCD, a presença de flavonóide e saponinas ou terpenos no extrato aquoso da *M. tenuiflora*;
- 2 – Por meio da análise por CLAE, foi possível identificar a presença de rutina e ácido clorogênico no extrato aquoso da *H. speciosa*;
- 3 – O extrato aquoso e as frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol da *M. tenuiflora* e o extrato aquoso, frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, os compostos isolados rutina e ácido clorogênico da *H. speciosa* inibiram a migração celular para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por carragenina;
- 4 – O extrato aquoso e as frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol da *M. tenuiflora* e o extrato aquoso, frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, os compostos isolados rutina e ácido clorogênico da *H. speciosa* apresentaram significativa diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias no exudato peritoneal, no modelo de peritonite induzida por carragenina;
- 5 – O extrato aquoso e as frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol da *M. tenuiflora* e o extrato aquoso, frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, os compostos isolados rutina e ácido clorogênico da *H. speciosa* inibiram a migração celular para a cavidade peritoneal, no modelo experimental de envenenamento induzido por *B. jararaca*;
- 6 – O extrato aquoso e as frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol da *M. tenuiflora* e o extrato aquoso, frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, os compostos isolados rutina e ácido clorogênico da *H. speciosa* foram capazes de reduzir significativamente a formação do edema e o influxo leucocitário para o músculo gastrocnêmio, em modelo de inflamação local induzida por *B. jararaca*;
- 7 – O extrato aquoso e as frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol da *M. tenuiflora* e o extrato aquoso, frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, os compostos isolados rutina e ácido clorogênico da *H. speciosa* foram capazes de inibir a migração celular, induzida por *T. serrulatus*, para a cavidade peritoneal de camundongos;
- 8 – O extrato aquoso e as frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol da *M. tenuiflora* e o extrato aquoso, frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, os compostos isolados rutina e ácido clorogênico da *H. speciosa* apresentaram significativa

diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias no exudato peritoneal, no modelo de envenenamento induzido pela peçonha de *T. serrulatus*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ACOSTA, P. O. et al. Edema y mionecrosis inducidos por veneno de *Bothrops jararaca* de Argentina en ratones. **The Journal of Applied Physiology**, v. 46, p. 233-238, 1996.

AHN, K. S. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor- κ B activation in RAW264.7 cells. **Life Sciences**, v. 76, n. 20, p. 2315-2328, 2005.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Comparisons between the use of medicinal plants in indigenous and rural caatinga (dryland) communities in NE Brazil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 7, n. 3, p. 156 – 170, 2008.

ALMEIDA, L. M. et al. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, p. 2153-2162, 2014.

AL-SAGHIR, J. et al. Anti-Inflammatory properties of Salograviolide A purified from Lebanese plant *Centaurea ainetensis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, p. 36, 2009.

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A. Acidentes por escorpiões. **Arquivo Brasileiro de Medicina**, v. 64, n.4, p. 212-216, 1990.

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A. Treatment of scorpion envenoming should include both a potent specific antivenom and support of vital functions. **Toxicon**, Oxford, v.38, p.1005-1007, 2000.

ANDRADE, F. D. P. **Investigação química de chás brasileiros**. 2002. 178p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

ANTON, R. et al. Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 153-157, 1993.

AZEVEDO, M. I. et al. The antioxidante effect of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular Pain**, v. 9, p. 14, 2013.

BARBOSA, K. P. et al., Reduction of carrageenan-induced acute pulmonary inflammation in mice by novel thiazolidinedione derivative LPSF/RA-4. **European Journal of Pharmacology**, v. 718, n. 1-3, p. 197-205, 2013.

BARROS, S. F. et al. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators of Inflammation**, v. 7, p. 339-346, 1998.

BENJAMIM, C. F. et al. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infection and Immunity**, v.70, p. 3602-3610, 2002.

BERNARD, P.; SCIOR, T.; DIDIER, B.; HIBERT, M.; BERTHOM, J. Y. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads Discovery: application to phospholipase A₂ inhibitors. **Phytochemistry**, v. 58, p. 865 – 874, 2001.

BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M. Selectins. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 379-387, 1993.

BEZERRA, M. M. P. **Comparação da capacidade neutralizante dos antisoros botrópicos comercial e monoespecífico frente a peçonha de *B. erythromelas***. 2000. 80p. Dissertação (Mestrado em biofísica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

BORGES, C. M, M. et al. Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, n. 4, p. 515-519, 2000.

BRASIL, ANVISA. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Resolução RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014.

BRASIL, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2^a ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

Brasil – Misnistério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN),2015.

BUCARETCHI, F. et al. Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. **Toxicon**, v. 89, p. 17 – 25, 2014.

BÜCHERL, W. Escorpionismo no Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v.34, p. 9-24, 1969.

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

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 1405 – 1414, 2007.

CAMARGO-RICALDE, S. L. Descripción, distribución, anatomía, composición química y usos de *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae) em México. **Revista Biologica Tropical**, v. 48, p. 939-954, 2000.

CAMPBELL, J. A. & LAMAR. 2004. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. Volume I. New York: Ithaca, 476p.

CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica**. São Paulo: Sarvier, 2003.

CARDOSO, J. L. C. **Acidentes por Animais Peçonhentos na Coordenação de Zoonoses e Animais Peçonhentos – Comentários e Sugestões**. Brasília: Ministério da Saúde, 1993.

CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, p. 468, 2003.

CARDOSO, J. L. C. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **International Journal of Medicine**, v. 86, p. 315-325, 1993.

CARDOSO, J. L. C. Introdução ao estudo dos acidentes por animais peçonhentos. Plantas venenosas e animais peçonhentos. **Schwartzman, S.**, Ed 2, p. 139-187, 1992.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Salvier, 2003.

CARVALHO, D. M. **Grandes sistemas nacionais de informação em saúde: revisão e discussão da situação atual**. Informe Epidemiológico do SUS, v.4, p. 7-46, 1997.

CASTRO, J. A. et al. Ethnobotanical study of traditional uses of medicinal plants: The flora of caatinga in community of Cravolândia – BA, Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 10, p. 1905 – 1917, 2011.

CAVALCANTE, W. L. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490 – 497, 2007.

CHAUDRY, I. H. et al. Immunological alterations following simple hemorrhage, in Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis, **Eds. F. Fasit, J. Ninnemann, and D. Green**, p. 363-373, 1989.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**. v. 33, p.31-39. 1995.

CHIPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, p. 823-846, 1998.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, p.1397-1406. 2001.

COSTA, E. S. et al. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants of the Cerrado, Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 705-707, 2008.

COSTA, E.P. et al. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper venom-induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, p. 13-17, 2002.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: escorpiões e aranhas. **Medicina**, v.36, p.490-497, 2003.

CUSINATO, D. A. C. et al. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 56, p. 1477 – 1486, 2010.

D`AVILA, C. A. M. et al. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1339-1346, 2002.

DA SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. Isolations and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA₂ activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655 – 666, 2008.

DA SILVA, S. L. et al. Molecular modeling and inhibition of phospholipase A2 by polyhydroxy phenolic compounds. **The European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 312-321, 2009.

DALE, M. M.; FOREMAN, J. C.; BAHL, A. K. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the accumulation and release of interleukin-1-like activity by peritoneal macrophages from the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v.113, n. 3, p.809-14, 1994.

DALMARCO, E. M.; MEDEIROS, Y. S.; FRODE, T. S. Cyclosporin A inhibits CD11a/CD18 adhesion molecules due to inhibition of TNF α and IL-1 β levels in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. **Cell Adhesion & Migration**, v. 2, n. 4, p. 231-235, 2008.

DARRAULT, R. O.; SCHLINDWEIN, C. Limited fruit production in *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) and pollination by nocturnal and diurnal insects. **The journal of biology and conservation**, v. 37, n.3, p.381-388, 2005.

DE CARVALHO, I. S. H. Potenciais e limitações do uso sustentável de biodiversidade do cerrado: Um estudo de caso da Cooperativa Grande Sertão no norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, 2007.

DE FÁTIMA, A. et al. Wound healing agents: the role of natural and non-natural products in drug development. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 879-888, 2008.

ENDRINGER, D. C. et al. Phytochemical study of *Hancornia speciosa* guided by *in vitro* cancer chemopreventive assays. In: **47th Annual Meeting of the American**

Society of Pharmacognosy, 2006, Washington. Abstract book of the 47th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, 2006.

ESCALANTE, T. et al. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 193, p. 17-28, 2003.

FARSKY, S. H. P. et al. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. In vivo and in vitro studies. **Toxicon**. v. 35, p.85-93, 1997.

FARSKY, S. H. P. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. In vivo and in vitro studies. **Toxicon**, v. 35, p. 185-193, 1997.

FERREIRA, A. L. **Atividade Antiulcerogênica da espécie Anacardium humile St. Hil. (Anacardiaceae)**. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP, Campinas/SP, 2005.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Nitric oxidedependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p.161-164. 2007.

FIALHO, E. M. S. et al. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 58, p. 480 – 485, 2011.

FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v. 31, p. 1551-1559, 1993.

FOGLIO, A. M. Q.; SOUZA, C. L.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **MutiCiência: revista interdisciplinar dos centros e núcleos da UNICAMP**. v. 7, 2006.

FRAZIER, R. A. et al. Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5189-5195, 2003.

FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: **Ownby, C.L., Odell, G.V. (Eds.), Natural Toxins: characterization, pharmacology and therapeutics**. p. 139–159. Pergamon Press: Oxford, 1989.

FRUSCELLA, P. et al. 1,5-Benzodiazepine tricyclic derivatives exerting anti-inflammatory effects in mice by inhibiting interleukin-6 and prostaglandin E2 production. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 5, p. 445-451, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, . 2001

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.

GHALIM, N. et al. Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.62, n.2, p. 277-283, 2000.

GOLENIOWSKI, M.E. et al. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 324-341, 2006.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Árvores Nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GONÇALVES, L. R. C.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 9, p. 101-107, 2000.

GOODMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro, 2005.

GORDON, D.; SAVARIN, P.; GUREVITZ, M.; ZINN-JUSTIN, S. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. **Journal of toxicology-toxin reviews**. v. 17, p. 131-159, 1998.

GRÜNEWALD, R. A. A jurema no “Regime de índio”: o caso aticum. In-*As muitas faces da Jurema – de espécie botânica à divindade afro-indígena*. Mota, C. N.; Albuquerque, U. P., eds., p. 97-124. Edições Bagaço: Recife, 2003.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira**. v.17. n.4, p.561- 84, 2003.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em Saúde. ed. 6. p. 106-108. Brasília. 2005.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. A review. **Memorial do Instituto Butantan**. v. 51, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Medicine**. v. 3, n. 412, 2006.

GUTIERREZ, J. M. Coprendiendo los venenos de serpientes: 50 anos de investigaciones em America Latina. **Revista de Biologia Tropical**, v. 50, p. 377 – 394, 2002.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. LEON, G. RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ÂNGULO, Y. Trends in snakesbite envenomation therapy: Scientific, technological and public health considerations. **Current Pharmacy Design**, v. 13, p. 2935 – 2950, 2007.

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. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 9, p. 4494-4497, 1981.

HAMILTON, R. C.; EINHORN, V. F. Action of venom the scorpion *Leiurus quinquestriatus* on release of noradrenaline from sympathetic nerve endings of the mouse vas deferens. **Toxicon**. v. 15, p. 403, 1977.

HARIDAS, V.; ARNTZEN, C. J.; GUTTERMAN, J. U. Avicins, a Family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), inhibit activation of nuclear factor- κ B by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 98, n. 20, p. 11557-11562, 2001.

HENDRA, R. et al. Antioxidante, anti-inflammatória e citotoxicidade de *Phaleria macrocarpa* (Boerl.) Scheff fruit. **BMC complementary and alternative medicine**. v. 11, p. 10, 2011.

HERING, S. E.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P. Acidentes por escorpiões II. In: SCHVARTSWAN, S. (ED.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. Cap.15, p.216-227. São Paulo: Sarvier, 1992.

IMPELLIZZERI, D. et al. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. **Biochemical Pharmacology**. v. 81, n. 5, p. 636-648, 2011.

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon**. v. 33, p. 825-58. 1995.

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon**. v.33, p.825-858, 1995.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, A. Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? **Toxicon**. v.26, p.233-236, 1988.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, A. Pharmacokinetics of ¹²⁵I-labelled IgG, F(ab')₂ and Fab fractions of scorpion and snake antivenoms: merits and potential for therapeutic use. **Toxicon**. v.36, n.11, p.1523-1528, 1998.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, A.; MURAD, A. M. Do changes in body temperature following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus* influence the course of toxicity? **Toxicon**. v.32, p.1265-1284, 1990.

ISMAIL, M.; ABD-ELSALAM, M. A.; AL-AHAIDIB, M. S. Pharmacokinetics of ¹²⁵I-labelled *Walterinnesia aegyptia* venom and its specific antivenoms: flash absorption and distribution of the venom and its toxin versus slow absorption and distribution of IgG, F(ab')₂ and Fab of the antivenin 1998. **Toxicon**. v.36, n.1, p. 93-114, 1998.

ISMAIL, M.; ABDULAH, M. E.; MURAD, A. M.; AGEEL, A. M. Pharmacokinetics of ¹²⁵I-labelled venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi*. **Toxicon**, v.18, p.301-308, 1980.

ISMAIL, M.; AMAL, J.; FATANI, Y.; DA BEES, T. T. Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: a review of common therapies and effect of kallikrein-kinin inhibitors. **Toxicon**. v.30, p.1257-1279, 1992.

ISMAIL, M.; SHIBL, A. M.; MORAD, A. M.; ABDULLAH, M. E. Pharmacokinetics of Ilabelled antivenom to the venom from scorpion *Androctonus amoreuxi*. **Toxicon**. v.91, p. 47-56, 1983.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; AKIYAMA, T.; LEE, K.H. Plantderived natural product research aimed at new drug discovery. **Nature Medicine**. v. 62, p. 263-280, 2008.

JANUARIO, A. H. et al. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteradeae): Anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-biological Interactios**, v. 150, p. 243 – 251, 2004.

JIANG, Y. et al. Structure of a new saponin from the bark of *Mimosa tenuiflora*. **Journal of Natural Products**. v. 54, n. 5, p. 1247-1253, 1991.

JIANG, Y. et al. Effects of saponins from *Mimosa tenuiflora* on lymphoma cells and lymphocytes. **Phytotherapy Research**. v. 6, p. 310-315, 1992.

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

KALAPOTAKIS, E. Spiders and scorpions, biology, venom and toxins. In: SIMPOSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 6, 2000. Sao Pedro. **Anais...** Sao Pedro: Cruzeirois, 2000.

KANG, J. H. et al. Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS stimulated peritoneal macrophages. **Cancer Letters**. v. 230, n. 2, p. 219-227, 2005.

KELLY, M. M. et al. The lung responds to zymosan in a unique manner independent of toll-like receptors. **American Jornal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 38, p.227-238, 2008.

KINI, R. M. Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1147-1161, 2005.

KHAN, H. A. Zymosan-induced luminoldependent chemiluminescence response of circulating and extravasated leukocytes in experimental sepsis. **Mediators of Inflammation**. v. 13, p. 123-125, 2004.

KOLEWE, M.E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S.C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecular Pharmacology**. v. 5, p. 243-256, 2008.

KONSTANTOPOULOS, K.; MCINTIRE, L. V. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. **Journal of Clinical Investigation**. v. 11, p. S19-S23, 1997.

KRIEGER, M.; HERZ, J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). **Annual Review of Biochemistry**. v. 63, p.601-637, 1994.

KUMAR, B.; VIJAYAKUMAR, M.; GOVINDARAJAN, R.; PUSHANGADAN, P. Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, p. 103-113, 2007.

LEE, J. Y. et al. Antitumor promotional effects of a novel intestinal bacterial metabolite (IH-901) derived from the protopanaxadiol-type ginsenosides in mouse skin. **Carcinogenesis**. v. 26, n. 2, p. 359-367, 2005.

LEMA, T. Lista comentada dos répteis ocorrentes no Rio Grande do Sul. *Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS, Sér. Zool.* v.7, p.41-150, 1994.

LEÓN, L. et al. Tenuiflorins A-C: new 2-phenoxychromones from the leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. **Planta Medica**. v. 70, n. 6, p. 536-539, 2004.

LIBBY, P.; SUKHOVA, G.; LEE, R. T.; GALIS, Z. S. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v.25, Suppl. 2, p. S9-S12, 1995.

LIMA, M. C. J. S. et al. *Ipomoea asarifolia* neutralizes inflammation induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 153, n. 3, p. 890-895, 2014.

LOMONTE, B. Tissue damage and inflammation induced by snake venom. 1994. Tese (Doutorado), Departamento de imunologia clínica da universidade de Goteborg. Suécia, Goteborg, 1994.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**. v. 17, p. 93-105, 1993.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. Ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

LOREVA, A.; BONILLA, C.; HIDALGO, J. Efecto neutralizador del extracto acuoso de *Dracontium loretense* (Jergón sachá) sobre La actividad letal del veneno de *Bothrops atrox*. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**. v. 23, n. 3, p. 177-181, 2006.

LOURENÇO, W. R. et al. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. Botucatu, v.2, n.2, p.121-134, 1996.

LOZOYA. X.; NAVARRO, V.; ARNASON, J. T.; KOURANY, E. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd) poir (tepescohuite) I – Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. **Archivos de Investigacion Medica**. v. 20, n.1, p. 87-93, 1989.

LUSTER A. D. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine**. v. 338, p.436-45, 1997.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**. v. 6, p. 1182-1190, 2005.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MACEDO. M.; FERREIRA, A. R.. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na bacia do alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Revista brasileira de farmacognosia**. 2005.

MAGALHÃES, M. M. et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**. v. 37, n. 8, p. 1155-1164, 1999.

MAHAJAN, V. S.; LESKOV, I. B.; CHEN, J. Z. Homeostasis of T cell diversity. **Cellular & Molecular Immunology**. v. 2, p.1-10, 2005.

MAIA, G. N. **Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação Gráfica e Editora, p. 237-246, 2004.

MALMONGE, J. A. et al. Comparative Study on the Technological Properties of Latex and Natural Rubber from *Hancornia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 111, p. 2986-2991, 2009.

MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2001.

MARIANO, V.A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 102, p. 364-370, 2005.

MARINHO, D. G. et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 135, p. 530-537, 2011.

MARINHO, D. G. et al. The látex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 135, p. 530-537, 2011.

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

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: EUFC, 1995.

MEBS, D. **venomous and poisonous animals**: A handbook for Biologists, toxicologists and toxinologists, Physicians and Pharmacists. Medpharm Scientific publishers, stuttgart, Germany, 2002.

MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; GONZALEZ, J. L. *In vitro* pharmacological properties of some extracts of *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite). **Archivos de Investigacion Medica**. v. 21, n. 2, p.163-169, 1990.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MEKI, M. A.; EL-DEAN, Z. M. M. Serum interleukin-1 β , interleukin-6, nitric oxide and α 1-antitrypsin in scorpion envenomed children. **Toxicon**. v. 36, n. 12, p. 1851-1859, 1998.

MELO, M .M.; MERFORT, I.; HABERMRL, G. G.; FERREIRA, K. M. Uso de extratos de plantas no tratamento local da pele de coelhos após envenenamento botrópico experimental. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 1, p. 100 – 106, 2003.

Ministério da Saúde – MS. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area>. Acesso em 20 mar. 2011.

MINTON Jr, S. A. Venom Diseases. **American Lectures Series**. Springfield: Charles C. Thomas, 1974.

MISE, Y. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; SILVA, R. M. L. Ação protetora da *Calendula officinalis* (asteraceae; compositae) sobre a atividade miotóxica do veneno de *Bothrops leucurus* (serpentes; viperidae). **Gazeta Médica da Bahia**. v.79 (Supl.1), p.50-55, 2009.

MORAES T. M. et al. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**. v.120, p.161-168, 2008.

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, p. 627 – 642, 2000.

MOSS, J.; KAZIC, T.; HENRY, D. P.; KOPIN, J. J. Scorpion venom induced discharge of catecolamines accompanied by hypertension. **Brain Research**. v. 54, p. 381-385, 1973.

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

- MOURA, V. M. et al. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: Na assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 224 – 232, 2015.
- MURPHY, H. S.; WARD, P. A. Inflamação. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Rubin, Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- NAKAYAMA, M. et al. Neuroprotective effects of flavonoids na hypoxia-, glutamate-, and oxidative stree – induced retinal ganglion cell death. **Molecular Vision**. v. 17, p. 1784-1793, 2011.
- NASCIMENTO JR, E. B. et al. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**. v. 45, n. 5, p. 585-593, 2005.
- NAZATO, V. S. et al. *In vivo* anthiophidian properties of *Dipteryx alata* Vogel bark extracts. **Molecules**, v. 15, p. 5956 – 5970, 2010.
- NISHIJIMA, C. M. et al. Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. **Molecules**, v. 14, p. 1072– 1080, 2009.
- NUNAN, E. A.; CARDOSO, V. N.; MORAES-SANTOS, T.; ARYA, V.; HOCHHAUS, G. Age effects on the pharmacokinetics of tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.37, p.385-390, 2004.
- NUNEZ, V. et al. Neutralization of the edema-forming, defrinating and coagulante effects os *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in colombia. **Brazilian Jornal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 969 – 977, 2004.
- OKOLI, C. O. et al. *Acanthus montanus*: An experimental evaluation of the antimicrobial, anti-inflammatory and immunological properties of a traditional remedy for furuncles. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 8, 2008.
- OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES, J. M. E.; CHIAVONE-FILHO, O., MEDEIROS, J. T. N. Estudo das condições de cultivo da Algaroba e Jurema preta e determinação do poder calorífico. **Revista de Ciência & Tecnologia**. v.14, p. 93-104, 1999.
- OLIVEIRA, C. Z. et al. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract of *Bauhinia forticata* against snake venom. **Journal os Ethnopharmacology**, v. 98, p. 213 – 216, 2005.
- OLIVEIRA, F. N. et al. Another record of significant regional variation in toxicity of *Tityus serrulatus* venom in Brazil: A step towards understanding the possible role of sodium channel modulators. **Toxicon**, v. 73, p. 33 – 46, 2013.
- OTERO, R. et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: traditional use of plants. **Journal os Ethnopharmacology**, v. 71, p. 493 – 504, 2002.

- PEREIRA, A. C. et al. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 30 – 35, 2015.
- PEREIRA, A. V.; LÔBO, K. M. S.; BEZERRA, D. A. C.; RODRIGUES, O. G.; ATHAYDE, A. C. R. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de jurema preta e meem sobre amostras de *Staphylococcus sp.* isoladas de mastite em búfalas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 76, n.3, p.341-346. 2009.
- PESSINI, A. C. et al. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Toxicon**. v. 48, n. 5, p. 556-566, 2006.
- PESSINI, A. C. et al. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **International Immunopharmacology**. v. 3, n. 5, p. 765-774, 2003.
- PETERS, J. A. & OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of neotropical squamata. Part I. Snakes. **Bulletin of the United States National Museum**. v. 297, p. 01-347, 1970.
- PETRICEVICH, V. L. et al. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**. v. 38, p. 1253-1266, 2000.
- PETRICEVICH, V. L. scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators of inflammation**. v. 2010, p.01-16, 2010.
- PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions *in vitro*. **Mediators of Inflammation**. v. 2005, n. 1, p. 39-49, 2005.
- PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**. v. 68, p. 2960-2972, 2007.
- PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D., Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. V. 47(1), p. 24-29, 2001.
- PLAEGER, S.F. Clinical immunology and traditional herbal medicines. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 10, p. 337-338, 2003.
- POSSANI, L. D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. **European Journal of Biochemistry**. v. 264, p. 287-300, 1999.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. Planaltina: EMBRAPA, 1994.
- PUCCA, M. B. Influence of post-starvation extraction time and prey-specific diet *in Tityus serrulatus* scorpion venom composition and hyaluronidase activity. **Toxicon**, v. 90, p. 326 – 336, 2014.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

REIS, F. P. et al. *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 352 – 357, 2014.

RIBEIRO, E. L. et al. Diethylcarbazine attenuates the development of carrageenan induced lung injury in mice. **Mediators of Inflammation**. v. 2014, p. 01-12, 2014.

RICHARDSON, J. D.; VASKO, M. R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 302, p. 839-845, 2002.

RIVERA-ARCE, E.; CHAVEZ-SOTO, M. A.; HERRERA-ARELLANO, A.; ARZATE, S.; AGUERO, J.; FERIA-ROMERO, I. A.; et al. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. **Journal of Ethnopharmacology**. v.109, p.523-528, 2007.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B.; PEREIRA, N.A. Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas animais, especialmente venenos de cobras. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 69, p. 82-86, 1988.

RODRIGUES, C. M. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. 2007. Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

RODRIGUES, C. M.; BRITO, A. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. **Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae)**. 29º Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2006.

ROTHSCHILD, A. M.; ROTHSCCHILD, Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. In: **Lee, C.Y. Snake Venoms: handbook of experimental pharmacology**. vol. 52. Springer, Berlin(Ed.), p. 591-628, 1979.

RUIZ, P. A. et al. Quercetin inhibits TNF-induced NF- κ B transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. **Journal of Nutrition**. v. 137, n. 5, p. 1208-1215, 2007.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**. v. 13, p. 161-171, 2008.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 161-171, 2008.

SAMPAIO, T.S.; NOGUEIRA, P.C.L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa*) at three stages of maturity. **Food Chemistry**. v. 95. p. 606-610, 2005.

SANTOS, P.O.; BARBOSA JUNIOR, A.M.; MÉLO, D.L.F.M.; TRINDADE, R.C. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu/SP. v. 9., n. 2, p. 108-111, 2007.

SERHAM, C.N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T.E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*. v. 8, p. 349-361, 2008.

SERRA, C.P. et al. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*. v. 12, p. 424-432, 2005.

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.

SHIN, H. S. et al. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chemistry*. v. 168, p. 167-175, 2015.

SIMÕES, C. O.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. [S.l.]: Editora da UFSC, 2003.

SOARES, M.R.M.; AZEVEDO, C.S.; MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.35, p.359-363, 2002.

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.

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

SOFER, S. et al. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. *Toxicon*. v. 34, p. 389-392, 1996.

SOUZA, E. T. et al. Antinociceptive activities of crude methanolic extract and phases, *n*-butanolic, chloroformic and ethyl acetate from *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 19, p. 115-120, 2009.

SOUZA, F. G.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; MAIA, G. A.; ARAUJO, I. A. Qualidade pós-colheita de frutos de diferentes clones de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia*. v. 31, n. 5, 2007.

SOUZA, R. S. O.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; AMORIM, E. L. C. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 51, n.5, p. 937-947, 2008.

SOUZA, W. M. **ESTUDO QUÍMICO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ALCALÓIDES INDÓLICOS DE *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson,**

APOCYNACEAE – (Agoniada). 2008. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SPELLBERG, B.; EDWARDS, J. E. Type1/Type 2 immunity in infectious diseases. **Clinical Infectious Diseases.** v. 32, p. 76-102, 2001.

SPIRANDELLI-CRUZ, E. F.; YASSUDA, W.; JIM J.; BARRAVIERA, B. Programa de controle de surto de escorpião *Tityus serrulatus* (Lutz e Mello, 1922), no Município de Aparecida (SP), (Scorpiones, Buthidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** Brasília, v.28, p.123-128, 1995.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Inflammatory reaction induced by *Tityus serrulatus* crude venom (TsV) in the lung of rats. **Journal of Venomous Animals and Toxins.** v. 3, p. 111-115, 1997.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet-activating factor (PAF). **Toxicon.** v. 32, p. 419-426, 1994.

TEXEIRA, C. F. P. et al. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jarararaca* snake venom. **International jornal of experimental pathology.** v. 86. p. 107-115, 2005

TOMLINSON, A. et al. Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. **British Journal of Pharmacology.** v. 113, n. 3, p. 693-698, 1994.

TORRES, J. B.; MARQUES, M. G. B.; MARTINI, R. K.; BORGES, V. A. An accident involving *Tityus serrulatus* and its epidemiological implications in Brazil. **Revista de Saúde Pública,** São Paulo, v.36, n.5, 2002.

TREBIEN, H. A.; CALIXTO J. B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions.** v. 26, p. 292-300, 1989.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **The FASEB Journal.** v. 1, n. 2, p. 89-96, 1987.

VILLARREAL, M. L.; NICASIO, P.; ALONSO-CORTES, D. Effects of *Mimosa tenuiflora* bark extracts on WI38 and KB human cells in culture. **Archivos de Investigacion Medica (Mexico).** v. 22, p. 163-169, 1991.

VITAL BRAZIL, O.; NEDER, A. C.; CORRADO. A. P. effects and mechanism of action of *Tityus serrulatus* venom on skeletal muscle. **Pharmaceutical Reasch Community.** v. 5, n. 2, p. 137-50. 1973.

VON EICKSTEDT, V. R. D.; RIBEIRO, L. A.; CANDIDO, D. M.; ALBUQUERQUE, M. J.; JORGE, M. T. Evolution of scorpionism by *Tityus bahiensis* (Perty) and *Tityus serrulatus* Lutz and Mello and geographical distribution of the two species in the State of São Paulo - Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins.** Botucatu, v.2, p.92-105, 1996.

WAGNER, H.; BLADT, S. Thin-Layer Chromatography Analysis of Herbal Drug Mixtures. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas SE - 8**. [S.l.: s.n.], 1996. p. 355-357.

WANDERLEY, C. W. S. et al. *Bothrops jararacussu* snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, p. 134 – 147, 2014.

WEN, F. H. (2003). Soroterapia. In: **Animais peçonhentos do Brasil**. (1 ed). São Paulo: Sarvier.

XAGORARI, A. et al. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 296, n. 1, p. 181-187, 2001.

XU, X.; XIE, B.; PAN, S.; LIU, L.; WANG, Y. Effects of sea buckthorn procyanidins on healing of acetic acid-induced lesions in the rat stomach. **Journal of Clinical Nutrition**. v.16, p. 234-238, 2007.

YAN Z. Q.; HANSSON G. K. Innate immunity, macrophage activation and atherosclerosis. **Immunological Reviews**. v. 219, p. 187-203, 2007.

YAQOOB, P. Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. **Trends in Immunology**. v. 24, n. 12, p. 639-645, 2003.

YOU, H. J. et al. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- κ B activation in the resting macrophages. **FEBS Letters**. v. 509, n. 2, p. 156-160, 2001.

ZAMUNER, S. R. et al. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon**. v. 39, p. 1505-1513, 2001.

ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUSCARÁ, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon**. v. 39, n. 10, p.1505-1513, 2001.

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, p. 251-357, 2002.

ZARBOCK A.; LEY K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. **American Journal of Pathology**. v. 172, p.1-7, 2008.

ZEGHAL, K. et al. Characterization and mechanisms of the cardiovascular and haemodynamic alterations induced by scorpion venom in rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 14, n. 4, p. 351-361, 2000.

ZOCCAL, K. F. et al., "Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. **Toxicon**. v. 61, n. 1, p. 1-10, 2013.

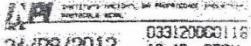

ZUCOLOTTO, S. M. **Estudo fitoquímico das folhas, frutos e raízes de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* degener.** 2005. 144f. Dissertação (Mestrado em farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ZUCOLOTTO, S. M.; BRANDT, R. Apostila de aulas práticas de farmacognosia. **Disciplina de Farmacognosia.** Curso de Farmácia. v. DFAR, CCS, 2001.

.

9. ANEXOS

9.1. Patentes depositadas

000716 Espaço reservado ao protocolo	 24/09/2012 03312000116 10:46 RERN  BR 10 2012 026958 9 Espaço para etiqueta
---	---

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
 O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
 1.2 Qualificação: INSTITUIÇÃO DE ENSINO SUPERIOR
 1.3 CNPJ/CPF: 24365710/0001-83
 1.4 Endereço Completo: CAMPUS UNIVERSITÁRIO S/N LAGOA NOVA, NATAL-RN
 1.5 CEP: 57072-970 1.6 Telefone: 84 3215-3914 1.7 Fax: 84 3215-3185
 1.8 E-mail: nit@reitoria.ufrn.br

continua em folha anexa

2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):**
 EXTRATOS, FRAÇÕES, COMPOSTOS ISOLADOS E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE
 ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM, HANCORNIA SPECIOSA, IPOMOEA ASARIFOLIA E MIMOSA
 TENUIFLORA APLICADOS NO TRATAMENTO

continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão:** do pedido N° _____ Data de Depósito: _____

5. **Prioridade:** interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. **Inventor (72):**

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA 6.3 CPF: 967.286.474-49
 6.2 Qualificação: DOCENTE
 6.4 Endereço completo: AV. MARIA LACERDA MONTENEGRO, Nº 1195, C-10, NOVA PARNAMIRIM
 6.5 CEP: 59152-600 6.6 Telefone: _____ 6.7 Fax: _____
 6.8 E-Mail: _____

Generated by CamScanner

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR


INPI
 INSTITUTO
 NACIONAL
 DA PROPRIEDADE
 INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Sistema de Gestão da Qualidade
 Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	DIRPA	Página:
	Formulário		1/3
Título do Documento:		Código:	Versão:
Depósito de Pedido de Patente		FQ001	2
		Procedimento:	
		DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
- 1.2 Qualificação: INSTITUIÇÃO DE ENSINO SUPERIOR
- 1.3 CNPJ/CPF: 24365710/0001-83
- 1.4 Endereço Completo: Av. Sen. Salgado Filho, 3000, Lagoa Nova, Campus UFRN
- 1.5 CEP: 59078-970
- 1.6 Telefone: 84 3215-3914 1.7 Fax: 84 3215-3185
- 1.8 E-mail: nit@reitoria.ufrn.br

 continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

Extratos, frações, compostos isolados e formulação farmacêutica de Spondias mombin aplicados no tratamento da inflamação

 continua em folha anexa**4. Pedido de Divisão: do pedido Nº**

Data de Depósito:

5. Prioridade: Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

 continua em folha anexa

9.2. Artigo publicado como autora

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2014, Article ID 378235, 8 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/378235>



Research Article

Neutralizing Effects of *Mimosa tenuiflora* Extracts against Inflammation Caused by *Tityus serrulatus* Scorpion Venom

Mariana Angélica Oliveira Bitencourt,¹ Maira Conceição Jerônimo de Souza Lima,¹ Manoela Torres-Rêgo,¹ Júlia Morais Fernandes,² Arnóbio Antônio da Silva-Júnior,¹ Denise Vilarinho Tambourgi,³ Silvana Maria Zucolotto,² and Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa¹

¹ Laboratory of Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Norte, Avenue General Gustavo Cordeiro de Farias, Petrópolis, 59012-570 Natal, RN, Brazil

² Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

³ Laboratory of Immunochemistry, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa; mpedrosa@ufrnet.br

Received 24 February 2014; Revised 5 May 2014; Accepted 8 May 2014; Published 11 June 2014

Academic Editor: Ruxana Sadikot

Copyright © 2014 Mariana Angélica Oliveira Bitencourt et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Scorpion bite represents a significant and serious public health problem in certain regions of Brazil, as well as in other parts of the world. Inflammatory mediators are thought to be involved in the systemic and local immune response induced by *Tityus serrulatus* scorpion envenomation. The aim of this study was to evaluate the effect of extracts of *Mimosa tenuiflora* on model envenomation. In mice, the envenomation model is induced by *Tityus serrulatus* venom. Previous treatment of mice with fractions from *M. tenuiflora* was able to suppress the cell migration to the peritoneal cavity. The treatment of mice with *M. tenuiflora* extracts also decreased the levels of IL-6, IL-12, and IL-1 β . We concluded that the administration of the extract and fractions resulted in a reduction in cell migration and showed a reduction in the level of proinflammatory cytokines. This study demonstrates, for the first time, the anti-inflammatory effect of aqueous extract from the *Mimosa tenuiflora* plant on *T. serrulatus* venom.

1. Introduction

Scorpion bite represents a significant and serious public health problem in certain regions of Brazil, as well as in other parts of the world, due to the frequency of their occurrence and to their potential for inducing severe, even fatal, clinical manifestations, especially among children [1]. In Brazil, most fatalities result from bites received from the *Tityus serrulatus* scorpion. The Brazilian Ministry of Health reports approximately 8000 scorpion bites/year, and the mortality rate among children is 1% [2].

The specific signs of scorpion envenomation are directly related to the venom components, with some patients developing an inflammatory response. Although the production of pro- and anti-inflammatory cytokines in response to tissue injury is essential to repair tissue structure and function,

excessive generation of proinflammatory cytokines can aggravate tissue damage [3]. Many different cytokines are released following severe envenomation. Increased interleukin IL-6 levels have been observed in plasma from patients with different grades of *T. serrulatus* envenomation. High levels of IL-6 and IL-1 were also observed in mice exposed to *Centruroides noxius* and *T. serrulatus* scorpion venoms [4–6]. Injection of scorpion venom into experimental animals produces systemic effects, with signs and symptoms similar to those observed in human envenomation, being fever, psychomotor agitation, salivation, lachrymation, increased gastrointestinal tract mobility, cardiac and respiratory arrhythmias, and arterial hypertension followed by hypotension, cardiac failure, pulmonary edema, and shock, among others [2, 7, 8]. These features have been traditionally explained by the effects of neurotransmitters released by the scorpion venom,

9.3. Artigos publicados como co-autora

Journal of Ethnopharmacology 153 (2014) 890–895



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Ipomoea asarifolia neutralizes inflammation induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom



Maira Conceição Jerônimo de Souza Lima^a, Mariana Angélica Oliveira Bitencourt^a, Allanny Alves Furtado^a, Hugo Alexandre Oliveira Rocha^b, Ruth Medeiros Oliveira^b, Arnóbio Antônio da Silva-Júnior^a, Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito^c, Denise Vilarinho Tambourgi^d, Silvana Maria Zucolotto^e, Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa^{a,*}

^a Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

^b Laboratório de Biotecnologia de Biopolímeros Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

^c Laboratório de Sistemas Dispersos, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

^d Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

^e Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2014

Received in revised form

7 March 2014

Accepted 19 March 2014

Available online 2 April 2014

Keywords:

*Ipomoea asarifolia**Tityus serrulatus*

Inflammation

Therapy

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Envenoming caused by scorpion sting is a serious public health problem. In Brazil, 13,038 accidents caused by venomous animals have been reported. Of this total, 53% of the cases and 14 deaths were caused by scorpions. Furthermore, *Tityus serrulatus* (Buthidae) is the most dangerous scorpion due to the high toxicity of its venom. The treatment is the common supportive therapy and the serum therapy, but some people do not have access to both therapies and seek healing through the use of medical plants.

Aim of the study: This study evaluated the ability of the crude extract and fractions from the leaves of *Ipomoea asarifolia* in neutralizing the main biological effects caused by *Tityus serrulatus* envenoming in mice. **Materials and methods:** BALB/c mice were pretreated (i.v.) with 100 μ l of aqueous extracts and fractions dichloromethane, ethyl acetate, and *n*-butanol (CH₂Cl₂, EtOAc, and *n*-BuOH, respectively) of *Ipomoea asarifolia*, rutin or saline. Then, the animals received 100 μ l (i.p.) of venom of *Tityus serrulatus* (0.8 mg/kg). After six hours, the peritoneal lavage was performed with PBS and the number cells were determined using a Neubauer chamber. The supernatants were collected for determination of cytokines, such as IL-6, IL-12, and IL-1 β .

Results: The aqueous extract, fractions and rutin, at all doses, significantly reduced cell migration, which was endorsed by the reduction of the levels of certain cytokines.

Conclusion: This is the first study that demonstrated the potential effect of *Ipomoea asarifolia* against inflammation caused by *Tityus serrulatus* venom, suggesting that these extracts and/or their bioactive molecules, especially the flavonoid rutin, have potential use in the therapy of this envenomation.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: AE, aqueous extract; BF, butanol fraction; CH₂Cl₂, dichloromethane; CH₂O₂, formic acid; CH₃OH, methanol; COBEA, Brazilian Committee for Animal Experimentation; DF, dichloromethane fraction; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EAF, ethyl acetate fraction; EtOAc, ethyl acetate; H₂O, Water; i.p., intraperitoneal; i.v., intravenous; IFN- γ , Interferon γ ; IL-12, interleukin 12; IL-1 α , interleukin 1 α ; IL-1 β , interleukin 1 β ; IL-6, interleukin 6; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium; *n*-BuOH, *n*-butanol; NP-**Reagent**, Natural Product Reagent; PBS, phosphate buffered saline; R_f, retention factor; TLC, phytochemical screening and thin layer chromatography; VTs, *Tityus serrulatus* venom

* Correspondence to: Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Gal. Gustavo Cordeiro de Farias, Petrópolis, Natal, RN, Brazil. Tel.: +55 84 3342.9820.

E-mail address: mpedrosa@ufrnet.br (M.d.F. Fernandes-Pedrosa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.060>

0378-8741/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Envenomation caused by scorpion sting is a public health problem in many countries, increasing the interest for studies related to this area. Recent data have shown that, in Brazil, of the total 13,038 accidents caused by poisonous or venomous animals, 53% of the cases of envenoming and 14 deaths were caused by scorpions (Ministério da Saúde, 2011). In Brazil, *Tityus serrulatus* (Buthidae) is the most dangerous due to the high toxicity of venom and may lead to death, especially when the victims are children (Torres et al., 2002; Freire-Maia et al., 1994).



Serum production against *Tityus serrulatus* scorpion venom using cross-linked chitosan nanoparticles as immunoadjuvant

Karla S. Rocha Soares^{a,b}, José L. Cardozo Fonseca^c, Mariana A. Oliveira Bitencourt^a, Kátia S.C.R. Santos^{a,b}, Arnóbio A. Silva-Júnior^{a,b}, Matheus F. Fernandes-Pedrosa^{a,b,*}

^aLaboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacéutica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

^cInstituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 July 2012
Accepted 11 September 2012
Available online 21 September 2012

Keywords:
Scorpion
Chitosan
Nanoparticles
Tityus serrulatus
Immunization

ABSTRACT

Several species of scorpions are known to cause accidents which can lead to death, most of them belonging to the genus *Tityus*. *Tityus serrulatus* is considered the most dangerous scorpion in South America. In Brazil, *T. serrulatus* is responsible for serious accidents, including deaths, which occur mainly with children and elderly people. Anti-scorpion sera are routinely produced by various institutions, and suitable technologies have been investigated for encapsulation and release recombinant or native proteins capable of inducing antibody production. In this context, biocompatible and biodegradable polymers, such as chitosan, have been employed for this purpose. This study aimed to obtain a protein release system for the peptides or proteins from *T. serrulatus*, based on cross-linked chitosan nanoparticles (CN) in order to generate a new model of immunization in animals, and consequently a potentially novel polyclonal serum, namely an anti-*T. serrulatus* venom. CN were successfully obtained by ionic gelation using the poly(anion triphosphate) (TPP), which demonstrated a suitable particle size of about 200 nm, with maximum encapsulation efficiency (100%) and enhanced antigen-specific antibody titers of 72K. The serum production data revealed that CN were equivalent to aluminum hydroxide, the traditional adjuvant for immunization. This study demonstrates that chitosan nanoparticles are a promising and safe system for peptide/protein delivery for *T. serrulatus* scorpion.

© 2012 Elsevier Ltd. Open access under the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

1. Introduction

The scorpion represents a deadly and serious public health problem in some countries due to the high incidence and/or severity of cases, and difficulty of management by public health services (Chippaux and Goyffon, 2008). In Brazil, approximately 10,000 human cases of scorpion sting

are treated at hospital centers and recorded annually, and 50% of these cases occur in the states of Minas Gerais and São Paulo (Ribeiro et al., 2010; Soares et al., 2002). Several species of scorpions are known to cause accidents which can lead to death in Brazil, most of them belonging to the genus *Tityus* (Raiho et al., 2011). The scorpion species *Tityus serrulatus* is the most prevalent (95%) and accounts for fatal stings, especially among children (Ribeiro et al., 2010; Soares et al., 2002).

The main problems involved with use of immunoadjuvants for vaccines and serums, includes the toxicity and side effects of these formulations (Gupta and Siber, 1995). Aluminum hydroxide is the only immunoadjuvant licensed

* Corresponding author. Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacéutica-Tedifar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas, Departamento de Farmácia, UFRRN, Av. Conde Gustavo Cordeiro de Brites s/n, Petrópolis-CIP- 59012-570, Natal, RN, Brazil.
E-mail address: mfpedrosa@ufrrn.br (M.F. Fernandes-Pedrosa).