



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

**JENIFER FROUCHE DE SOUZA**

Potencial antiveneno do extrato da planta *Schwartzia brasiliensis* e de dez derivados 1,2,3-triazol contra ações tóxicas dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *B. jararacussu*

Tese de Doutorado submetida à  
Universidade Federal Fluminense visando a obtenção do grau de  
Doutora em Ciências e Biotecnologia

**Orientador: Prof. Dr. André Lopes Fuly**  
**Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Rodrigues da Silva**



Niterói  
2023

**JENIFER FROUCHE DE SOUZA**

**Potencial antiveneno do extrato da planta *Schwartzia brasiliensis* e de dez derivados 1,2,3-triazol contra ações tóxicas dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *B. jararacussu***

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Venenos e Toxinas de Animais e Avaliação de Inibidores (LAVENOTOXI) do Departamento de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense.

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPERJ, IFS, PROPPi-UFF.

Tese de Doutorado submetida à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando a obtenção do grau de Doutora em Ciências e Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. André Lopes Fuly**

**Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Rodrigues da Silva**

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

D278p De Souza, Jenifer Frouche  
Potencial antiveneno do extrato da planta *Schwartzia brasiliensis* e de dez derivados 1,2,3-triazol contra ações tóxicas dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *B. jararacussu* / Jenifer Frouche De Souza. - 2023.  
113 f.: il.

Orientador: André Lopes Fuly.  
Coorientador: Ana Cláudia Rodrigues Da Silva.  
Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, 2023.

1. Planta. 2. Serpentes. 3. Antiveneno. 4. 1,2,3-triazol. 5. Produção intelectual. I. Fuly, André Lopes, orientador. II. Da Silva, Ana Cláudia Rodrigues, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

**JENIFER FROUCHE DE SOUZA**

**Potencial antiveneno do extrato da planta *Schwartzia brasiliensis* e de dez derivados 1,2,3-triazol contra ações tóxicas dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *B. jararacussu***

Tese de Doutorado submetida à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando a obtenção do grau de Doutora em Ciências e Biotecnologia.

**Banca Examinadora:**

**Prof. Dr. André Lopes Fuly – Departamento de Biologia Celular e Molecular (GCM) – Universidade Federal Fluminense (UFF) – Orientador/Presidente**

**Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Rodrigues Da Silva – Departamento de Biologia Celular e Molecular (GCM) – Universidade Federal Fluminense (UFF) – Coorientadora**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Laneuville Teixeira – Departamento de Biologia Marinha – Universidade Federal Fluminense (UFF) – Membro titular interno**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Christina de Palmer Paixão – Departamento de Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal Fluminense (UFF) – Membro titular interno**

**Prof. Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto – Departamento de Biologia Geral – Universidade Federal Fluminense (UFF) – Membro titular interno**

**Prof. Dr. Jorge Saad Nehme – Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) – Membro titular externo**

**Prof. Dr. Luiz Carlos Simas Pereira Junior – E.M. Prof. Darcy Ribeiro - Maricá/EMASM – Niterói – Membro titular externo**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karen de Jesus Oliveira – Departamento de Fisiologia e Farmacologia –  
Universidade Federal Fluminense (UFF) – Membro interno: revisor/suplente.**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Russolina Benedeta Zingali – Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de  
Meis – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – Membro suplente externo**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, “Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas” (Romanos 11:36).

Aos meus pais, pelo incentivo, paciência e suporte para que eu sempre realize da melhor forma possível minha formação acadêmica.

Ao meu namorado Patrick agradeço pela paciência, incentivo, por torcer sempre por mim e apoiar minhas decisões.

Ao orientador Prof. Dr. André Fuly pela oportunidade de ingressar em um projeto extremamente importante. Muito obrigada pelos ensinamentos e paciência comigo até aqui. Obrigada!

À coorientadora Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia, agradeço todos os aprendizados passados e todo suporte.

Às amigas Hosana, Camila e Tamiris agradeço por serem luz na minha vida, por terem me fornecido suporte e terem sido pilar para que conseguisse chegar até esse momento.

Aos colegas do laboratório LAVENOTOXI, aqueles que pude contar, sempre prestativos a ajudar.

Aos colaboradores da Fiocruz, UFF, UFRJ e FUNED. Obrigada por contribuírem com este trabalho.

Aos membros da banca agradeço por aceitarem o convite e participarem deste momento dividindo seus conhecimentos e dispendo de seu tempo para analisar minha tese.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia (PPBI) e a Universidade Federal Fluminense. Agradeço especialmente a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Carla Castro, e aos coordenadores Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Evelize Folly.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	X
Lista de ilustrações (Figuras, Quadros e Tabelas).....	XII
Resumo.....	XVI
Abstract.....	XVII
1. Introdução.....	1
1.1 Serpentes no Brasil.....	12
1.2 Composição do veneno e quadro clínico.....	16
1.3 Tratamento.....	21
1.4 <i>Schwartzia brasiliensis</i> .....	24
1.5 Derivados 1,2,3-triazol.....	26
2. Objetivo.....	29
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3. Material e Métodos.....	31
3.1 Obtenção do veneno das serpentes.....	32
3.2 Obtenção dos animais.....	32
3.3 Obtenção do extrato aquoso da planta <i>Schwartzia brasiliensis</i> .....	32
3.4 Obtenção dos derivados sintéticos 1,2,3-triazol.....	33
3.5 Atividade coagulante do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	34
3.5.1 Efeito do extrato ou derivados sintéticos na atividade coagulante do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	35
3.6 Atividade proteolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	35
3.6.1 Efeito do extrato ou derivados sintéticos na atividade proteolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	36
3.7 Atividade hemolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> .....	36
3.7.1 Efeito do extrato ou derivados sintéticos na atividade hemolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> .....	37
3.8 Atividade hemorrágica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	38
3.8.1 Efeito do extrato ou derivados sintéticos na atividade hemorrágica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	38

3.9 Atividade edematogênica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	39
3.9.1 Efeito do extrato ou derivados sintéticos na atividade edematogênica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	40
3.10 Atividade letal do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	40
3.10.1 Efeito do extrato ou derivados sintéticos na atividade letal do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	40
3.11 Toxicidade do extrato da planta e derivados sintéticos .....	41
3.11.1 Através do teste <i>in vitro</i> de hemotoxicidade.....	41
3.11.2 Através do teste <i>in vivo</i> de dose aguda.....	41
3.11.3 Através do teste <i>in silico</i> .....	42
3.12 Análise estatística.....	42
4. Resultados.....	43
4.1. Toxicidade do extrato aquoso de <i>S. brasiliensis</i> .....	45
4.2 Atividade coagulante do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	45
4.2.1 Efeito da planta <i>S. brasiliensis</i> na atividade coagulante do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	46
4.3 Atividade proteolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	47
4.3.1 Efeito da planta <i>S. brasiliensis</i> na atividade proteolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	48
4.4 Atividade hemolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> .....	49
4.4.1 Efeito da planta <i>S. brasiliensis</i> na atividade hemolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> .....	50
4.5 Atividade hemorrágica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	51
4.5.1 Efeito da planta <i>S. brasiliensis</i> na atividade hemorrágica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> no protocolo de incubação.....	52
4.5.2 Efeito da planta <i>S. brasiliensis</i> na atividade hemorrágica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> no protocolo de tratamento.....	53
4.6 Efeito da planta <i>S. brasiliensis</i> na atividade edematogênica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> no protocolo de incubação.....	58
4.6.1 Efeito da planta <i>S. brasiliensis</i> na atividade edematogênica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> no protocolo de tratamento.....	59

4.7 Efeito da planta <i>S. brasiliensis</i> na atividade letal do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> no protocolo de incubação.....	60
4.7.1 Efeito da planta <i>S. brasiliensis</i> na atividade letal do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> no protocolo de tratamento.....	61
4.8 Efeito dos derivados sintéticos 1,2,3-Triazol na atividade coagulante do veneno de <i>B. jararaca</i> .....	63
4.9 Efeito dos derivados sintéticos 1,2,3-Triazol na atividade proteolítica e hemolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> no protocolo de incubação.....	64
4.10 Efeito dos derivados sintéticos 1,2,3-Triazol na atividade hemorrágica e edematogênica do veneno de <i>B. jararaca</i> no protocolo de incubação.....	65
4.10.1 Efeito dos derivados sintéticos 1,2,3-Triazol na atividade hemorrágica do veneno de <i>B. jararaca</i> no protocolo de tratamento.....	66
4.10.2 Efeito dos derivados sintéticos 1,2,3-Triazol na atividade hemorrágica do veneno de <i>B. jararaca</i> no protocolo de prevenção.....	68
4.11 Efeito dos derivados sintéticos 1,2,3-Triazol na atividade letal do veneno de <i>B. jararaca</i> no protocolo de incubação.....	69
4.12 Toxicidade dos derivados sintéticos 1,2,3-triazol.....	70
4.12.1 Análise <i>in vivo</i> .....	70
4.12.2 Análise <i>in silico</i> .....	70
5. Discussão.....	73
6. Conclusões.....	82
7. Referências Bibliográficas.....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg – Micrograma

ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

*B. alternatus* – *Bothrops alternatus*

*B. jararaca* – *Bothrops jararaca*

*B. jararacussu* – *Bothrops jararacussu*

*B. moojeni* – *Bothrops moojeni*

*B. neuwiedi* – *Bothrops neuwiedi*

CE – Concentração Efetiva

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CMC – Concentração Mínima Coagulante

CMHI – Concentração Mínima Hemolítica Indireta

COBEA – Comissão Nacional de Bem-Estar Animal

DMH – Dose Mínima Hemorrágica

DMSO - Dimetilsulfóxido

DTNs – Doenças Tropicais Negligenciadas

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

GBD – Global Burden of Disease (Carga Global de Doenças)

i.d. – intradérmica

i.p. – intraperitoneal

i.v. – intravenosa

*L. muta* – *Lachesis muta*

NAL – Núcleo de Animais de Laboratório

OMS – Organização Mundial da Saúde

p/p – peso/peso

p/v – peso/volume

RPM – rotação por minuto

*S. brasiliensis* – *Schwartzia brasiliensis*

s.c. – subcutânea

SAB – soro antibotrópico

SABC – soro antibotrópico e anticrotálico

SABL – soro antibotrópico e antilaquético

SAC – soro anticrotálico

SAE ou SAEla – soro antielapídico

SAL – soro antilaquético

SEM – Erro Padrão da Média

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

TCA – ácido tricloroacético

v/v – volume/volume

WHO – World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

### FIGURAS:

**Figura 1:** Distribuição geográfica do número estimado de envenenamentos e mortes por envenenamento de serpentes. Fonte: adaptado de Gutiérrez *et al.*, 2017...4

**Figura 2:** Taxas de mortalidade por envenenamento por picada de serpente padronizadas por idade em ambos os sexos em 2019. Plataforma de informações e dados sobre picadas de serpentes. [https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/snakebite-envenoming/snakebite-information-and-data-platform/overview#tab=tab\\_1](https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/snakebite-envenoming/snakebite-information-and-data-platform/overview#tab=tab_1) (2022).....4

**Figura 3:** Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero de serpente peçonhenta no Brasil, 2020 (SINAN, 2022)..... 5

**Figura 4:** (A) Representação da fosseta loreal e presas inoculadoras; (B) Representação da falta da fosseta loreal e a presença de presas inoculadoras pouco desenvolvidas (Manual de Tratamento e Diagnóstico de Acidentes por Animais Peçonhentos – FUNASA, 2001).....13

**Figura 5:** Tipos de dentição: (1) Dentição áglifa; (2) Dentição opistóglifa; (3) Dentição proteróglifa; (4) Dentição solenóglifa (Animais peçonhentos, FUNED, 2014).....14

**Figura 6:** Formato da cauda das serpentes do gênero *Bothrops*, gênero *Crotalus* e gênero *Lachesis* (Manual de Tratamento e Diagnóstico de Acidentes por Animais Peçonhentos – FUNASA, 2001).....14

**Figura 7:** (A) *Bothrops jararaca* (Jararaca); (B) *Bothrops jararacussu* (Jararacussu ou Jararacuçu); (C) *Crotalus durissus* (Cascavel); (D) *Lachesis muta* (Surucucu) e (E) *Micrurus sp* (Coral verdadeira). Fonte: <http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/serpentes-venenosas.html>.....15

**Figura 8:** Distribuição relativa de componentes tóxicos dos venenos elapídicos e viperídicos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). 3FTx, toxina de três dedos (ID de acesso ao Banco de Dados de Proteínas (PDB ID): 1IJC); CRISP, proteína secretora rica em cisteína (PDB ID: 3MZ8); CTL, proteína tipo lectina tipo C (PDB ID: 1IXX); DTx, dendrotoxina (PDB ID: 1DTX); LAO, L-aminoácido oxidase (PDB ID: 2IID); Myo, miotoxina de baixa massa molecular (PDB ID: 4GV5); PLA2, fosfolipase A2 (PDB ID: 1TGM para o monômero e PDB ID: 3ROL para o dímero); SVMP, metaloproteinase de veneno de serpente (PDB ID: 3DSL para classe PIII e PDB ID: 1ND1 para classe PI); SVSP, serina proteinase de veneno de serpente (PDB ID: 1OPO).....17

**Figura 9:** Efeitos tóxicos dos venenos de serpentes. 3FTx, toxina de três dedos; PLA2, fosfolipase A2; SVMP, metaloproteinase de veneno de serpente; SVSP, serina proteinase de veneno de serpente.....18

<b>Figura 10:</b> Efeito clínico causado pelo envenenamento por serpentes. (a) inchaço e bolhas; (b) inchaço, bolhas, gangrena e equimoses; (c) gengivorragia; (d) quemose conjuntival; (e) ptose palpebral bilateral; (f) paralisia dos músculos oculares; (g) necrose extensa da pele e tecido subcutâneo (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2017).....	20
<b>Figura 11:</b> À esquerda: planta da espécie <i>Schwartzia brasiliensis</i> . À direita: distribuição geográfica pelo Brasil. Fonte: <a href="https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB103323">https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB103323</a> .....	25
<b>Figura 12:</b> Estrutura do 1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol.....	27
<b>Figura 13:</b> Estrutura do 1,2,3-triazol evidenciando a possível adição no anel visando a síntese de diferentes compostos orgânicos.....	27
<b>Figura 14:</b> Estruturas químicas dos dez derivados sintéticos (AM001 a AM010) desenhadas no editor ChemDraw Ultra 7.0 .....	34
<b>Figura 15:</b> Atividade coagulante sobre o plasma do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	45
<b>Figura 16:</b> Efeito do extrato da planta <i>S. brasiliensis</i> na coagulação induzida por <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	46
<b>Figura 17:</b> Atividade proteolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	47
<b>Figura 18:</b> Efeito do extrato da planta <i>S. brasiliensis</i> na proteólise induzida por <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	48
<b>Figura 19:</b> Atividade hemolítica do veneno de <i>B. jararaca</i> .....	49
<b>Figura 20:</b> Efeito do extrato da planta <i>S. brasiliensis</i> na hemólise causada pelo veneno de <i>B. jararaca</i> .....	50
<b>Figura 21:</b> Fotos ilustrativas da hemorragia causada pelo veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	51
<b>Figura 22:</b> Efeito do extrato da planta <i>S. brasiliensis</i> na hemorragia induzida por <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> no protocolo de incubação.....	52
<b>Figura 23:</b> Efeito do extrato da planta <i>S. brasiliensis</i> na hemorragia induzida pelo veneno de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> no protocolo de tratamento.....	53
<b>Figura 24:</b> Efeito do extrato de <i>S. brasiliensis</i> na hemorragia causada pelos venenos de <i>B. jararaca</i> e <i>B. jararacussu</i> .....	55

**Figura 25:** Efeito do extrato aquoso da planta *S. brasiliensis* na hemorragia induzida pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* no protocolo de tratamento...57

**Figura 26:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* no edema induzido por *B. jararaca* e *B. jararacussu*.....58

**Figura 27:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* na atividade edematogênica induzida pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* no protocolo de tratamento.....59

**Figura 28:** Efeito dos derivados 1,2,3-triazol na coagulação do plasma ou fibrinogênio induzida pelo veneno de *B. jararaca*.....63

**Figura 29:** Efeito dos derivados 1,2,3-triazol nas atividades proteolítica e hemolítica causada pelo veneno de *B. jararaca*.....64

**Figura 30:** Efeito dos derivados 1,2,3-triazóis na hemorragia e edema induzido pelo veneno de *B. jararaca*.....65

**Figura 31:** Efeito dos derivados 1,2,3 triazol AM006 ou AM010 em conjunto com o soro antibotrópico na hemorragia induzida pelo veneno de *B. jararaca*.....67

**Figura 32:** Efeito dos derivados AM006 ou AM010 na hemorragia induzida pelo veneno de *B. jararaca* no protocolo de prevenção.....68

#### TABELAS:

**Tabela 1:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* na letalidade causada pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*.....60

**Tabela 2:** Efeito do extrato de *S. brasiliensis* na letalidade induzida pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*.....61

**Tabela 3:** Efeito dos derivados 1,2,3-triazóis na atividade letal causada pelo veneno de *B. jararaca*.....69

#### QUADROS:

**Quadro 1:** Características das principais famílias de toxinas de venenos ofídicos (OLIVEIRA *et al.*, 2022).....7

**Quadro 2:** Número de ampolas de antiveneno específico indicado para cada tipo e gravidade do acidente (Ministério da Saúde, 2019).....23

**Quadro 3:** Análise *in silico* dos derivados sintéticos (AM001 – AM010) através da ferramenta AdmetSAR.....71

**Quadro 4:** Resumo dos resultados do extrato da planta *Schwartzia brasiliensis* e dos derivados 1,2,3-triazóis nas atividades: coagulante, proteolítica, hemolítica, hemorrágica, edematogênica e letal no protocolo de incubação.....72

## RESUMO

O envenenamento por serpentes é um problema de saúde pública em todo mundo, principalmente nos países tropicais, subtropicais e nos países em desenvolvimento. O veneno das serpentes é composto por uma mistura de proteínas com diversas propriedades tóxico-farmacológicas. Os efeitos causados pelo envenenamento podem ser sistêmicos e locais, como: hemorragia, distúrbios de coagulação, dor, hipovolemia, paralisia neuromuscular. O tratamento preconizado pelo Ministério da saúde é a soroterapia, que apresenta algumas desvantagens, como: ineficácia em neutralizar os efeitos locais, pode causar reações alérgicas ou febre e tem alto custo de produção. Entretanto, a soroterapia é extremamente eficaz na prevenção do óbito. Na literatura científica, trabalhos demonstram o potencial antiveneno da planta *Schwartzia brasiliensis* e de moléculas obtidas por síntese orgânica. Além disso, a planta *Schwartzia brasiliensis* apresenta efeitos anti-inflamatório, analgésico e tripanocida. E, derivados sintéticos do triazol têm ação antifúngica, anti-inflamatória e antiviral. Desta forma, explorar o potencial antiveneno de plantas e de derivados sintéticos se torna promissor. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* em inibir algumas atividades tóxicas causadas pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* e de dez derivados 1,2,3-triazol (designados de AM001 a AM010) apenas contra o veneno de *B. jararaca*. De uma maneira geral, o extrato de *S. brasiliensis* inibiu as atividades *in vitro* (coagulante, proteolítica e hemolítica) e *in vivo* (hemorrágica, edematogênica e letal) de ambos os venenos; e da mesma forma, os dez derivados foram eficazes contra o veneno de *B. jararaca*. O extrato da planta foi capaz de inibir a hemorragia de *B. jararaca* e *B. jararacussu* mesmo se injetado depois da injeção do veneno. Nesta abordagem experimental, diferentes vias de administração (intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, oral, subcutânea) da planta nos animais foram investigadas. E, similarmente, os derivados AM006 e AM010 foram eficazes na neutralização da hemorragia, do edema e letalidade causados pelo veneno de *B. jararaca*, mesmo se administrados antes ou depois da injeção do veneno de *B. jararaca*. O soro antibotrópico se injetado em separado com os derivados AM006 e AM010 não foi capaz de aumentar a eficácia de neutralização da hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca*. Entretanto, quando o soro e estes dois derivados foram previamente incubados e, em seguida, a mistura administrada após a injeção do veneno de *B. jararaca*, a eficácia na neutralização aumentou significativamente; e para o AM010, o percentual de inibição foi de 85%. O extrato da planta ou os dez derivados sintéticos não apresentaram efeito tóxico *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. Sendo assim, a planta *S. brasiliensis* e os dez derivados 1,2,3-triazol poderiam ser utilizados para diminuir os efeitos tóxicos causados pelos venenos das serpentes *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

**Palavras-chave:** planta; 1,2,3-triazol; serpentes; neutralização; antiveneno.

## ABSTRACT

Snakebite envenoming is a worldwide public health problem, especially in tropical, subtropical, and developing countries. Snake venom is composed of a mixture of proteins with many toxic-pharmacological properties. The effects caused by envenoming can be classified, as systemic (bleeding, blood clotting imbalance, cardiovascular alterations, and neuromuscular paralysis) and local (hemorrhage, pain, tissue necrosis, and inflammation). The treatment recommended by the Ministry of Health is serotherapy, which has some disadvantages, such as: ineffectiveness in neutralizing the local effects, can cause allergic reactions or fever, and has a high production cost. However, serotherapy is extremely effective in preventing death. In the scientific literature, some studies have demonstrated antivenom potential of the plant *Schwartzia brasiliensis*, as well as molecules obtained by organic synthesis. The plant *Schwartzia brasiliensis* is a medicinal plant with anti-inflammatory, analgesic and trypanocidal effects. On the other hand, molecules derived of triazole have antifungal, anti-inflammatory, antiviral action, and antivenom effect has investigated by our group. Thus, in this context, exploring antivenom potential of plants and organic derivatives of triazoles is a promising issue in toxinology. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the aqueous crude extract of *S. brasiliensis* in inhibiting some toxic activities caused by the venom of *B. jararaca* and *B. jararacussu*, as well as ten 1,2,3-triazole derivatives (designated as AM001 to AM010) against *B. jararaca* venom. Overall, the extract of *S. brasiliensis* inhibited the *in vitro* (coagulant, proteolytic, and hemolytic) and *in vivo* (hemorrhagic, edematogenic, and lethal) activities of both venoms; and likewise, the ten derivatives were effective against the *B. jararaca* venom. Furthermore, the plant extract was able to inhibit the *B. jararaca* and *B. jararacussu* hemorrhage when injected after the venom injection, testing different routes of administration of the plant (intradermal, intraperitoneal, intravenous, oral, and subcutaneous). Similarly, the derivatives AM006 and AM010 were effective in neutralizing the hemorrhage, edema, and lethality caused by *B. jararaca* venom, even if they were administered before or after the injection of *B. jararaca* venom. On the opposite, the commercial antiothropic serum was not efficient to inhibit hemorrhage. However, a mixture containing antiothropic serum and the derivatives AM006 and AM010 inhibited the hemorrhage caused by the venom of *B. jararaca*. The plant extract or the ten synthetic derivatives did not show toxic effects *in vivo*, *in vitro* or *in silico*. In conclusion, the plant *S. brasiliensis* and the ten 1,2,3-triazole derivatives could be used to reduce the toxic effects caused by the venoms of *B. jararaca* and *B. jararacussu*, and the derivatives together with the antiothropic serum enhanced the inhibitory percentage of hemorrhaging caused by the venom of *B. jararaca*.

**Keywords:** plant; 1,2,3-triazole; snakes; neutralization; antivenom.

# **1. INTRODUÇÃO**

As serpentes habitam o planeta Terra há cerca de 125 milhões de anos, desde o período Cretáceo. Elas são encontradas em quase todo globo terrestre, mas ocupam predominantemente as regiões temperadas e tropicais, pois são animais ectotérmicos que necessitam de fonte de calor externo para realizar sua termorregulação e garantir assim sua sobrevivência em ambientes terrestres, subterrâneos e arbóreos. Além disso, as serpentes também se adaptaram em ambientes aquáticos, e habitam as águas continentais e oceânicas (FUNED, 2014; MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002). As serpentes podem ser chamadas de cobras, ofídios e pertencem a Ordem Squamata e subordem Serpentes ou Ophidia, e têm cerca de três mil espécies no mundo, mas apenas 410 trazem algum tipo de risco ao homem (BARRAVIERA, 1993). O Brasil tem cerca de 412 espécies, o que corresponde a cerca de 10% do total de serpentes do mundo; sendo 63 peçonhentas (NOGUEIRA *et al.*, 2019; ROMANO-HOGE, 1990).

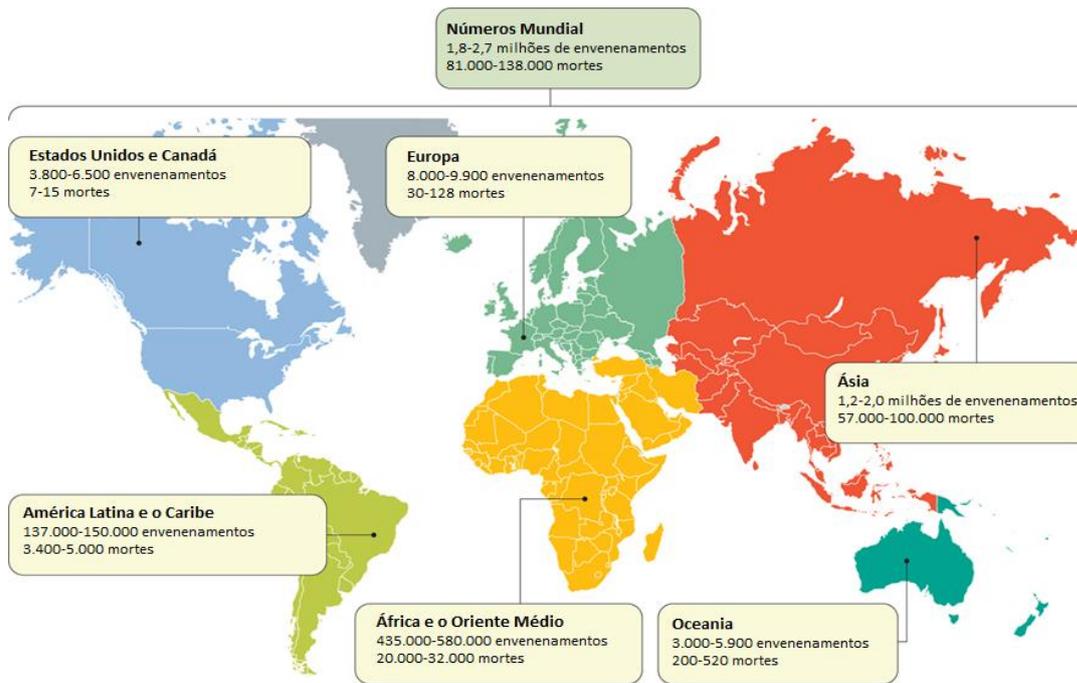
Algumas espécies de serpentes são consideradas como os animais mais venenosos do mundo. O veneno das serpentes se desenvolveu ao longo da evolução para imobilização, captura ligeira e morte das presas, além da defesa contra os seus predadores (CALVETE, 2011).

O envenenamento por picada de serpente é atualmente considerado uma doença tropical negligenciada (DTN), afetando mais de 5 milhões de pessoas em todo o mundo e causando cerca de 150 mil mortes a cada ano, além de amputações, deformações e outras consequências. A luta contra o envenenamento por picada de serpente em escala global requer a implementação de uma estratégia de resposta integrada envolvendo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a comunidade científica, fabricantes de antivenenos, agências reguladoras, autoridades de saúde nacionais e regionais, organizações de profissionais de saúde, indústrias farmacêuticas, agências de saúde, agências de financiamento internacionais, grupos de defesa e sociedade civil. De fato, para prevenir, diminuir e tratar os acidentes ofídicos é um problema complexo, que exige cooperação de vários segmentos da sociedade e requer colaboração de diferentes áreas da ciência, como medicina, farmácia, biologia, ecologia, enfermagem, dentre outras. Depois de ter sido removido em 2013 da lista de DTN de “Categoria A”, o envenenamento por picada de serpente foi colocado em 2017 em resposta à escassez de antivenenos e à defesa de grupos de pesquisas e

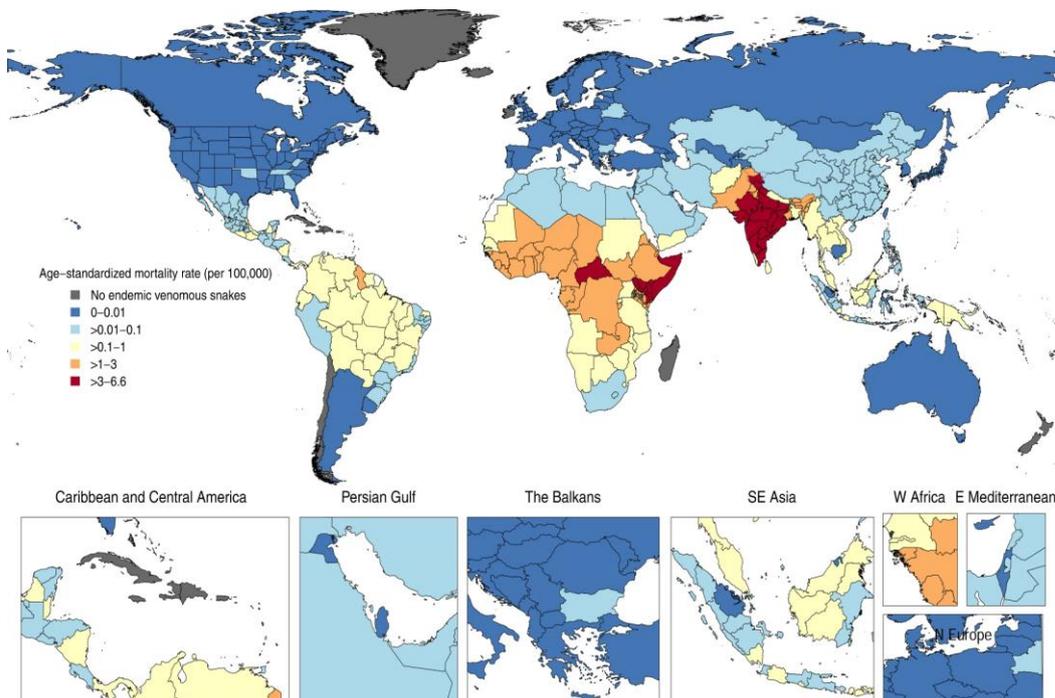
ONGs internacionais (CHIPPAUX, 2017; BAGCCHI, 2015). Ressalta-se que foi extremamente importante essa realocação na “Categoria A”, pois dessa forma pode-se receber recursos financeiros de maneira rápida e prioritária do Departamento de DTNs da OMS. Em 2019, a OMS estabeleceu a meta de reduzir pela metade o número de mortes e casos de envenenamento por picada de serpente até 2030 (WHO, 2017; CHIPPAUX, 2017).

Aproximadamente 1,8 a 2,7 milhões de acidentes ofídicos acontecem por ano em todo o mundo, ocasionando cerca de 138 mil óbitos (Figura 1) (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Em torno de 400.000 pessoas sofrem com complicações devido ao envenenamento, como amputações ou deformidades do membro acometido pela picada. Devido a estas complicações gera-se um grande impacto negativo sócio econômico para àquela comunidade (THE LANCET, 2019; WHO, 2021). Na África, Ásia, América Latina e em alguns locais da Oceania, o envenenamento por serpentes é causa um elevado número de casos de morbidade e mortalidade (VONGPHOUMY *et al.*, 2015; GUTIÉRREZ *et al.*, 2006). Todavia, vale a pena ressaltar que estes dados são subnotificados, visto que existe uma omissão de registro nas regiões mais afetadas, em virtude da falta de hospitalização ou razões culturais (VAIYAPURI *et al.*, 2013).

Outra informação sobre a estatística dos acidentes ofídicos no mundo está mostrada na figura 2, que foi realizado pelo “Carga Global de Doenças” (GBD- Global Burden of Disease). O GBD, que é coordenado pelo Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), é uma rede global com 5.647 colaboradores em 152 nações e territórios, que trabalham em mais de 1.100 universidades, centros de pesquisa e agências governamentais. O GBD tem sido usado para direcionar as políticas de saúde em várias nações e jurisdições locais, bem como em organizações internacionais, incluindo o Banco Mundial e a Organização Mundial da Saúde (THE LANCET, 2020).

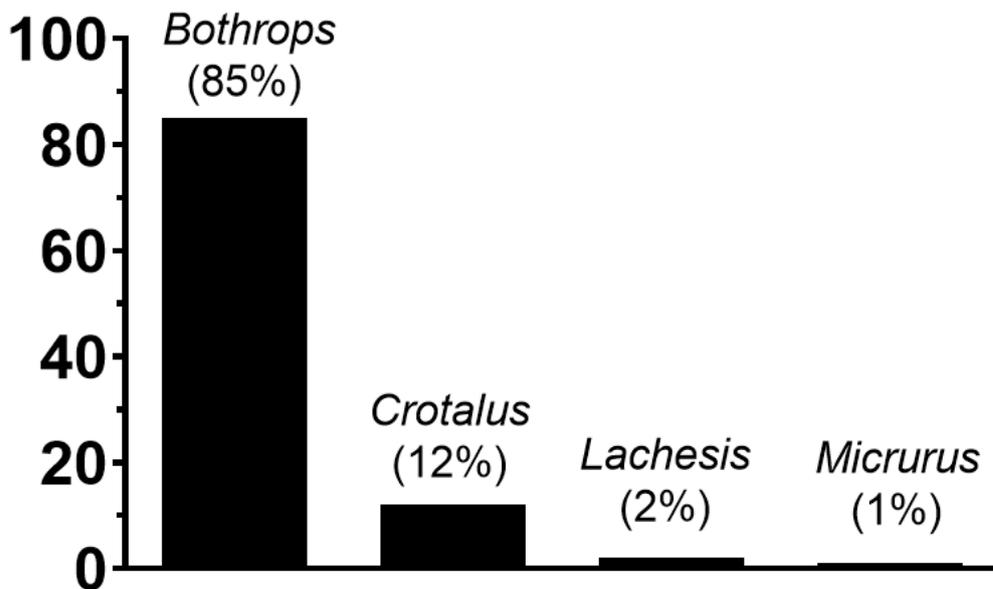


**Figura 1:** Distribuição geográfica do número estimado de envenenamentos e mortes por envenenamento de serpentes. Adaptado de Gutiérrez *et al.*, 2017.



**Figura 2:** Taxas de mortalidade por envenenamento por picada de serpente padronizadas por idade em ambos os sexos em 2019. Plataforma de informações e dados sobre picadas de serpentes. [https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/snakebite-envenoming/snakebite-information-and-data-platform/overview#tab=tab\\_1](https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/snakebite-envenoming/snakebite-information-and-data-platform/overview#tab=tab_1) (2022).

No Brasil, existem 412 espécies de serpentes, sendo 63 peçonhentas (NOGUEIRA *et al.*, 2019). No ano de 2020, o Brasil registrou cerca de 255 mil acidentes por serpentes peçonhentas com 120 mortes. Estes envenenamentos foram causados por serpentes do gênero *Bothrops* (85%), seguido dos gêneros *Crotalus* (12%), *Lachesis* (2%) e *Micrurus* (1%) (Figura 3) (SINAN, 2022). As serpentes de importância médica no Brasil pertencem a duas famílias: Viperidae (gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) e Elapidae (gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*) (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).



**Figura 3:** Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta no Brasil, 2020. Adaptado de SINAN, 2022.

Em termos absolutos, as serpentes continuam sendo as principais contribuintes dos acidentes causados por animais peçonhentos, seguido de escorpiões e aranhas. Em média são 25.000 acidentes por serpentes, 8.000 por escorpiões e 5.000 por aranhas, com 150 mortes por serpentes, 38 por escorpiões e 10 por aranhas. Vale a pena destacar que as notificações no Brasil por animais peçonhentos ocupam o segundo lugar, com cerca de 850 mil notificações, seguido apenas da Dengue com 2 milhões de agravos (BRASIL, 2016). Entretanto, sabe-se que esse quantitativo é subnotificado por diversos fatores, como falha na identificação da serpente e baixa qualidade na notificação. O índice médio de letalidade dos acidentes ofídicos é cerca de 0,43% (BRASIL, 2016). Acredita-se que o Brasil é o terceiro país em número de acidentes por serpentes peçonhentas (BARRAVIERA, 1993). As regiões Nordeste e

Norte do Brasil são as registraram o maior número, enquanto que as regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste apresentaram os menores índices, em geral na última década (BRASIL, 2016, SINAN, 2022). De uma maneira geral, os meses de abril a setembro apresentaram maior incidência e com maior prevalência em indivíduos do sexo masculino (55%) na faixa etária entre 10 a 49 anos (72%). Os membros inferiores são os mais acometidos (82%) e agricultores (62,7%) são a maioria e no próprio local de trabalho, ou seja, a região rural tem maior índice (BRASIL, 2016).

A partir de meados do século XX, pesquisadores observaram a riqueza nos constituintes do veneno e passaram a isolar e analisar as estruturas e atividades de suas toxinas, pois muitas delas têm potencial para serem transformadas em medicamentos. A maioria das toxinas do veneno de serpente pertence a uma das 30 famílias (fosfolipase A<sub>2</sub>; serino-protease de veneno de serpentes; metaloproteinase de veneno de serpentes) (FRY, 2005; OJEDA, 2017), embora o veneno de uma determinada espécie de serpente possa conter centenas de compostos bioativos (TASOULIS *et al.*, 2022; CALVETE *et al.*, 2009). A composição dos venenos ofídicos apresenta alta complexidade e diversidade (CALVETE, 2011).

Os venenos de serpentes consistem de uma mistura complexa de componentes, dos quais a maioria (>90%) são peptídeos e proteínas com as bioatividades dominantes incluindo neurotoxicidade, hemotoxicidade e citotoxicidade dependendo da espécie da serpente (TASOULIS & ISBISTER, 2017). A composição do veneno varia amplamente entre espécies e até mesmo dentro da mesma espécie devido à idade, sexo, disponibilidade de presas, dieta e localização geográfica, entre outros fatores. Diversas pesquisas visam elucidar a estrutura, reatividade e alvo das toxinas do veneno, a fim de compreender sua função e determinar seus determinantes moleculares de reconhecimento e potencial terapêutico. O quadro 1 resume as informações atualmente disponíveis para diversas famílias de toxinas (TASOULIS *et al.*, 2022; CHANDA *et al.*, 2019; SENJI LAXME *et al.*, 2019).

**Quadro 1:** Características das principais famílias de toxinas de venenos ofídicos (OLIVEIRA et al., 2022).

Família de toxinas	Família serpente	Atividade enzimática	Principais alvos biológicos	Principais atividades fisiopatológicas	Aplicações terapêuticas promissoras
PLA2	Elapídeos e Viperídeos	Sim	Membrana plasmática dos miócitos e vários receptores no axolema (alvo molecular indeterminado)	Necrose aguda do músculo esquelético, paralisia flácida, reações inflamatórias locais (edema, influxo de leucócitos nos tecidos e dor)	antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterobacter aerogen</i> , antiparasitários; anti HIV e dengue
SVMP	Elapídeos (P-III SVMPs) e viperídeos (PI, P-II e P-III SVMPs)	Sim	Grande variedade de alvos; os mais notáveis são o colágeno IV e os fatores de coagulação sanguínea	Predominantemente, atividade hemorrágica, mas pode causar a degradação proteolítica do fibrinogênio e da fibrina, induzir a apoptose e inibir a agregação plaquetária.	coagulação sanguínea, fibrinólise e agregação plaquetária
SVSP	Elapídeos e Viperídeos	Sim	Principalmente fatores de coagulação sanguínea	Desequilibra o sistema hemostático através da ação na cascata de coagulação nos sistemas fibrinolítico e caliceína-cinina	Prevenção da formação de trombos através da depleção de fibrinogênio; anticoagulante; aplicado em procedimentos neurocirúrgicos e como selante de fibrina
3FTx	Elapídeos	Não	Receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina, acetilcolinesterase e cardiomiócitos (alvo molecular indeterminado)	Efeitos neurotóxicos, que causam paralisia; fasciculações musculares; e parada cardíaca por lise de cardiomiócitos	Regulação da pressão arterial; tratamento de distúrbios de coagulação; ação analgésica
LAO	Elapídeos e Viperídeos	Sim	L - aminoácidos; substrato varia entre espécies	Efeitos hemorrágicos ou anticoagulantes, indução de apoptose, edema e agregação ou inibição plaquetária	Antimicrobiano contra <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>S. aureo</i> ; antiparasitário o contra <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i> ; potencial antiviral contra HIV-1
CRiSP	Elapídeos e Viperídeos	Não	Canais de Ca <sup>2+</sup> , canais de K <sup>+</sup> e cascatas de sinalização envolvidas na adesão celular	Inibe a angiogênese, aumenta a permeabilidade vascular e promove respostas inflamatórias (infiltração de leucócitos e neutrófilos)	Antiparasitário contra <i>Leishmania</i> e cepas de tripanossoma; antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas e fungos filamentosos

CTL/SNACLEC	Viperídeos	Não	Receptores plaquetários e celulares, bem como fatores de coagulação, como fator IX e fator X	Efeitos diversos, incluindo hemaglutinação, atividade mitogênica, agregação plaquetária, edema, permeabilidade vascular elevada, efeitos renais, hipotensão, citotoxicidade e modulação da liberação de Ca <sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático do músculo esquelético	Uso em terapias anticoagulantes
DIS	Viperídeos	Não	Integrinas	Interrompe a adesão célula-célula e a adesão célula-matriz e inibe a angiogênese	Antiinflamatório e antiangiogênico; antiplaquetário (eptifibatida e tirofiban) ; tratamento para processos neoplásicos
NPs	Elapídeos e Viperídeos	Não	Receptores NP A, B e C	Efeitos hipotensores potentes (relaxamento vascular e diminuição da contratilidade miocárdica), levando à rápida perda de consciência	Doenças cardiovasculares
KPI	Elapídeos e Viperídeos	Não	Proteases e canais K <sup>+</sup>	Efeitos de inibição sobre uma série de serina proteases, incluindo plasmina e tripsina, levando à anticoagulação, fibrinólise, inflamação e bloqueio de canais iônicos	Redução do desenvolvimento de cistos em doenças renais policísticas
DEF	Elapídeos e Viperídeos	Não	Canais de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> do músculo esquelético, membranas lipídicas e sarcolema	Danos miotóxicos através da despolarização dos músculos esqueléticos e atividade analgésica	Antiproliferativo, antinociceptivo, antiinflamatório, antifúngico contra <i>C. albicans</i> , anti-Plasmodium, anti-Leishmania e anti-helmíntico

3FTx, toxina de três dedos; CRiSP, proteína secretora rica em cisteína; CTL/SNACLEC, lectina tipo C e tipo-lectina tipo C; DEF, defensina; DIS, desintegrina; KPI, inibidor de serina protease tipo Kunitz; LAAO, l-aminoácido oxidase; NPs, peptídeo natriurético; PLA2, fosfolipase A2; SVSP, serina protease de veneno de serpentes; SVMP, metaloproteinase de veneno de serpentes.

O Ministério da Saúde prescreve como tratamento para o envenenamento por serpentes, a soroterapia heteróloga. O soro, também chamado de antiveneno é produzido apenas em grandes centros, a partir da hiperimunização de equinos (GUTIÉRREZ, 2002). A soroterapia é totalmente eficaz na prevenção ao óbito, quando

administrado no tempo e de forma correta. Todavia, a soroterapia apresenta desvantagens, como a incapacidade de reverter os efeitos locais causados pelo envenenamento, alto custo de produção e possíveis reações adversas, como febre e anafilaxia. Além destas, como o antiveneno é produzido e distribuído apenas para os grandes centros urbanos e/ou que tenham estrutura hospital adequados, existe a dificuldade de acesso a este tratamento em algumas regiões mais remotas e/ou que não possuam aparato hospitalar e recursos humanos especializados (SAAVEDRA *et al.*, 2018; SCHESKE *et al.*, 2015; GUTIÉRREZ *et al.*, 1998). Consequentemente, a procura por um novo tratamento, que seja alternativo ou complementar ao atual torna-se de extrema necessidade.

Decidir quando iniciar o tratamento antiveneno pode ser difícil, principalmente para médicos inexperientes, pois os sinais de envenenamento e o momento de início variam de acordo com o gênero da serpente, a quantidade de veneno injetado, o local da injeção e a idade e saúde do indivíduo. Além disso, as diretrizes clínicas atuais recomendam suspender a administração de antiveneno até que os sintomas de envenenamento sistêmico sejam detectados em pacientes (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Embora salvem vidas, os antivenenos apresentam limitações terapêuticas (HARRISON *et al.*, 2011; HARRISON & GUTIÉRREZ, 2016). O antiveneno convencional tem eficácia limitada contra alguns efeitos tóxicos do envenenamento, como dano tecidual local e, quando o tratamento é retardado, neurotoxicidade pré-sináptica. Além disso, apenas 10-15% de IgG em um frasco de antiveneno é específico contra proteínas de veneno, porque os animais utilizados para a fabricação de antiveneno já possuem sistemas imunológicos maduros e a hiperimunização com veneno é incapaz de gerar títulos mais elevados de IgG antiveneno. Finalmente, quanto maior a disparidade filogenética entre as serpentes cujos venenos são utilizados para imunização, maior será o número de especificidades de IgG geradas nos animais imunizados com veneno. Isto significa que a proporção de IgG total direcionada ao veneno de qualquer serpente é pequena e, consequentemente, são necessários mais frascos para alcançar a cura clínica. Isto cria um paradoxo terapêutico porque cada frasco extra de antiveneno aumenta tanto o risco de efeitos adversos potencialmente graves induzidos pelo antiveneno como o custo do tratamento. Assim, são necessários

antivenenos poliespecíficos e altamente eficientes, sem comprometer a segurança e o preço acessível (CALVETE, 2013).

As plantas medicinais constituem uma prática integrativa e complementar de saúde amplamente utilizada pela população para o tratamento de diversas doenças e tem sido uma prática antiga e comum ao longo dos anos (DUTRA *et al.*, 2016). As plantas contêm um grande arsenal de componentes químicos que podem ser úteis, mas também representam um possível risco à saúde. Assim, usuários, profissionais de saúde e prescritores devem conhecer a planta, incluindo a identificação adequada, conservação, modo de preparo e uso, e quaisquer potenciais efeitos colaterais (PEDROSA *et al.*, 2021).

Há uma longa história de utilização de plantas medicinais no Brasil devido à sua rica biodiversidade e patrimônio cultural (DUTRA *et al.*, 2016). Nesse sentido, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi criado em 2016 para proporcionar acesso seguro e gratuito às plantas medicinais na atenção básica brasileira (PEDROSA *et al.*, 2021). Um total de 79 plantas medicinais foram utilizadas pela população, sendo as mais comuns *Melissa officinalis* (31%), *Peumus boldus* (24,4%), *Mentha spicata* (20,9%), *Matricaria recutita* L. (18,2%), *Rosmarinus officinalis* (17%), *Foeniculum vulgare* (14,7%), *Leonurus sibiricus* L. (10%), *Citrus limonum* L. (9,7%) e *Plantago major* (6,2%). Segundo de Araújo *et al.* (2014), as plantas mais utilizadas foram *Peumus boldus* (21%), *Melissa officinalis* (14,3%), *Cymbopogon citratus* (7,7%), *Coleus amboinicus* (6,7%), *Matricaria recutita* L. (5,4%), e *Foeniculum vulgare* (5,3%), indicando semelhanças com as plantas medicinais mais utilizadas no presente estudo (ZENI *et al.*, 2017).

Produtos naturais vêm sendo alvos de pesquisas para o tratamento do envenenamento por serpentes. Tradicionalmente, sabe-se que um grande repositório de plantas medicinais fitoterápicas possui atividade contra veneno de serpentes. Uma exploração dos benefícios terapêuticos destas plantas medicinais utilizadas no tratamento de picadas de serpente revela a presença de vários fitoquímicos com potencial antiveneno. As plantas já são vastamente utilizadas no tratamento do acidente ofídico, pois já foram descritas por trabalhadores rurais e comunidades

indígenas por possuírem propriedades antiveneno (MALANGE *et al.*, 2019; GIOVANNINI E HOWES, 2017).

Dados da literatura mostram que a espécie *Schwartzia brasiliensis* é rica em flavonóides. Os extratos desta espécie apresentaram propriedades anti-inflamatória, analgésica e tripanocida, a partir de análises de suas características químicas e atividades biológicas (FIALHO *et al.*, 2016). *Schwartzia brasiliensis*, pertencente à família Marcgraviaceae é uma trepadeira e espécie de planta com flor do Brasil, popularmente conhecida como "agarra-pé", distribuída de Norte a Sul, e em todas as restingas costeiras brasileiras (MAIA & SILVA, 2016). *S. brasiliensis* é uma rica fonte de taninos, flavonóides e compostos fenólicos (FIALHO *et al.*, 2016), e esses compostos possuem algumas atividades farmacológicas, como: anti-inflamatória, analgésica, antifúngica (JONES *et al.*, 2000), antibacteriana (YAMAGUTI-SASAKI *et al.*, 2007), proteção contra danos no DNA (LAGO *et al.*, 2007), antiviral e tripanocida (FIALHO *et al.*, 2016). Na medicina popular, a planta *S. brasiliensis* é utilizada como chá para tratamento de doenças cardíacas, mas não há validação científica para comprovar eficácia ou segurança previamente registrada, bem como uso no tratamento de doenças cardíacas (AGRA *et al.*, 2008).

Os produtos químicos encontrados na natureza têm sido utilizados para fins terapêuticos desde a antiguidade. Os antigos egípcios e gregos usavam ácido salicílico da casca do salgueiro para tratar dores. No século XIX, os químicos da Bayer modificaram esta substância para produzir a aspirina. Produtos naturais como o ácido salicílico, são pequenas moléculas produzidas por plantas, bactérias e fungos que foram selecionadas pela evolução para estabilidade e interação com polímeros biológicos (proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e membranas lipídicas) (DIAS *et al.*, 2012; MITCHELL, 2011; BUTLER & BUSS, 2006).

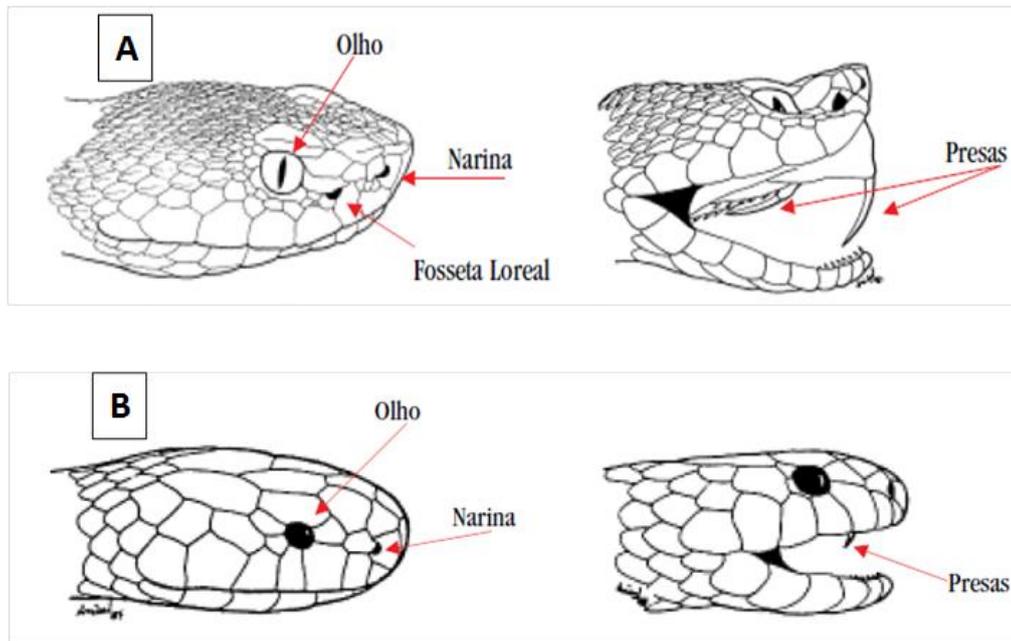
Em adição aos produtos naturais, em especial às plantas, moléculas obtidas por síntese orgânica também vêm sendo pesquisadas objetivando o desenvolvimento de fármacos. E, dessas moléculas, podemos destacar os triazóis. Os triazóis são os principais antifúngicos utilizados no tratamento e prevenção de micoses sistêmicas (LASS-FLÖRL, 2011). Os derivados triazóis são extensivamente investigados para o tratamento de várias doenças como: câncer (LAAMARI *et al.*, 2021), doenças virais

(SHADYRO *et al.*, 1999), tuberculose (KERI *et al.*, 2015), infecções fúngicas (TERRA *et al.*, 2018) e distúrbios de coagulação (MOURA *et al.*, 2016). Além disto, também são investigados no tratamento do envenenamento por serpentes (CAMPOS *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2013).

## 1.1 SERPENTES NO BRASIL

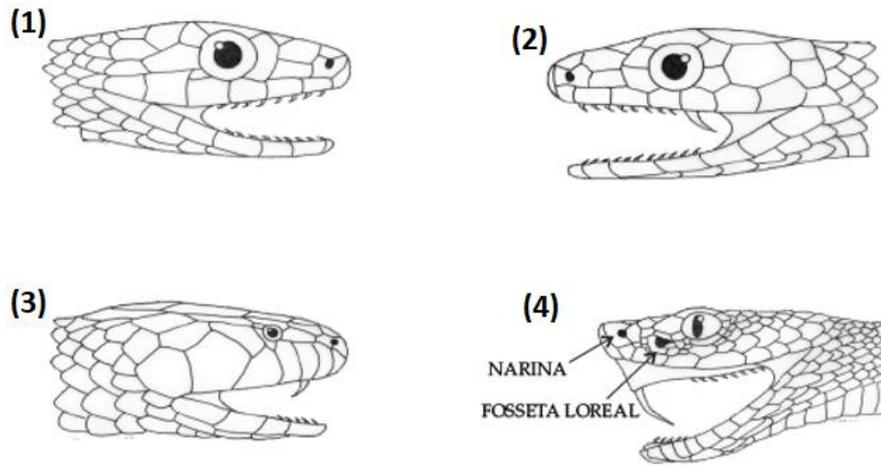
As serpentes são répteis que pertencem ao Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Reptilia, Ordem Squamata e Subordem Serpentes ou Ophidia. No Brasil existem 412 espécies de serpentes (NOGUEIRA *et al.*, 2019). As serpentes peçonhentas no Brasil pertencem a duas famílias: Elapidae, com gênero *Micrurus* e *Leptomicrurus*; e Viperidae, com gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. Estas duas famílias apresentam as espécies mais perigosas e peçonhentas do mundo (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Através de algumas características físicas torna-se possível diferenciar as serpentes peçonhentas das não peçonhentas. As viperídeas possuem um órgão sensorial termorreceptor, denominado fosseta loreal, posicionado entre os olhos e a narina. Além disto, possuem dentes móveis inoculadores, localizados na região anterior da boca. Estas particularidades são exclusivamente das serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (viperídeas) (Figura 4A). Por outro lado, as serpentes do gênero *Micrurus* e *Leptomicrurus* não apresentam fosseta loreal, e possuem dentes inoculadores fixos e pouco desenvolvidos situados na região anterior da boca (Figura 4B) (FUNASA, 2001).



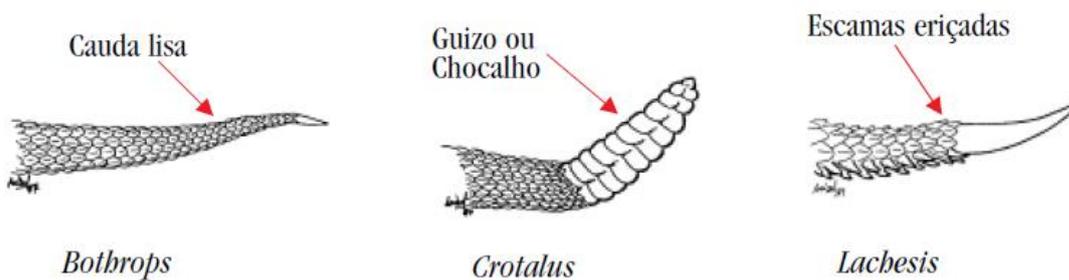
**Figura 4:** (A) Representação da fosseta loreal e presas inoculadoras; (B) Representação da falta da fosseta loreal e a presença de presas inoculadoras pouco desenvolvidas (Manual de Tratamento e Diagnóstico de Acidentes por Animais Peçonhentos – FUNASA, 2001).

As serpentes peçonhentas possuem uma glândula secretora especializada, quando a serpente morde sua vítima, o veneno armazenado nesta glândula é expelido através de um músculo compressor e liberado para os dutos que estão presentes nas presas, e assim injetados nos músculos da vítima (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). As serpentes, sejam elas peçonhentas ou não peçonhentas, apresentam dentição diferenciada, e suas presas inoculadoras apresentam diferentes tamanhos, e localizam-se na região anterior ou posterior da boca. Existem quatro diferentes tipos de dentição das serpentes (1) Áglifa – Ausência de dentes inoculadores e glândulas secretoras de venenos (exemplo: jiboias e sucuris); (2) Opistóglifa – Dente inoculador fixo, que inclui um sulco por onde percorre o veneno, presente na parte posterior da boca (exemplo: falsas corais, muçuranas e cobras-cipó); (3) Proteróglifa – Dente inoculador imóvel, encontra-se na região anterior da boca, os dentes também apresentam sulcos (exemplo: corais verdadeiras); (4) Solenóglifa – Os dentes são grandes e bem desenvolvidos, localizam-se na parte anterior da boca. Possui canal por onde atravessa o veneno (exemplo: cascavéis, jararacas e surucucus) (Figura 5) (FUNED, 2014).



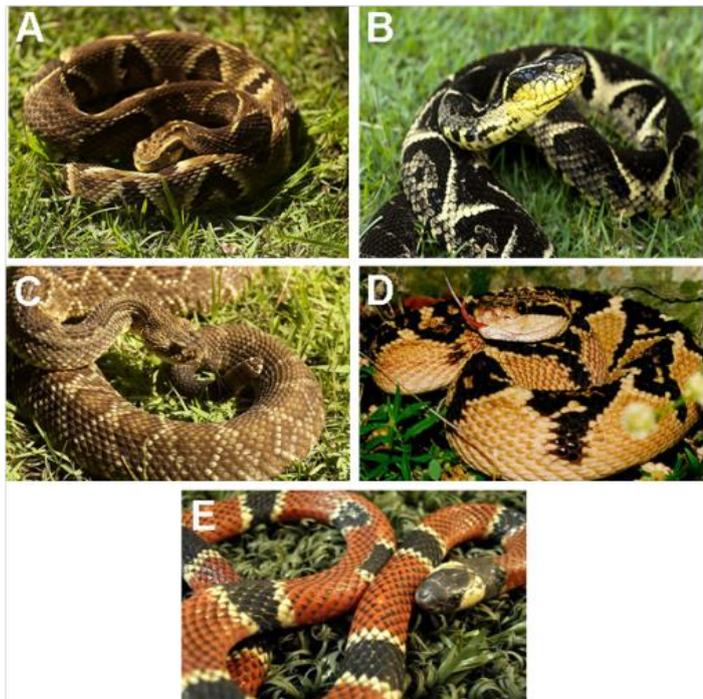
**Figura 5:** Tipos de dentição: (1) Dentição áglifa; (2) Dentição opistóglifa; (3) Dentição proteróglifa; (4) Dentição solenóglifa. Adaptado de Animais peçonhentos – FUNED, 2014.

Além dos diferentes tipos de dentição e presença ou ausência de fosseta loreal, outras características também são importantes para identificação e diferenciação das serpentes peçonhentas. As serpentes do gênero *Micrurus* não apresentam fosseta loreal, e podem ser identificadas facilmente pela sua coloração diferenciada, pois estas apresentam anéis coloridos ao longo do corpo. Uma forma de diferenciar as serpentes que apresentam fosseta loreal é através do formato da cauda, sendo do gênero *Bothrops* uma cauda lisa, do gênero *Lachesis*, uma cauda com escamas arrepiadas e do gênero *Crotalus*, uma cauda com chocalho (Figura 6) (FUNASA, 2001).



**Figura 6:** Formato da cauda das serpentes do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (Manual de Tratamento e Diagnóstico de Acidentes por Animais Peçonhentos – FUNASA, 2001).

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 85% dos envenenamentos por serpentes no Brasil. Este gênero apresenta cerca de 30 espécies, dentre *B. jararaca* (Figura 7A), localizadas nas regiões sul e sudeste, e *B. jararacussu* (Figura 7B), encontradas no cerrado da região central e florestas da região sudeste. O gênero *Crotalus* apresenta somente uma espécie de serpente, *C. durissus* tendo esta espécie cinco subespécies. São responsáveis por 8% dos acidentes ofídicos no Brasil. São conhecidas popularmente como cascavel e habitam a região Centro-oeste, Minas Gerais, norte de São Paulo, caatinga do Nordeste, região Norte e ilha de Marajó (Figura 7C). O gênero *Lachesis* é representado somente pela espécie *L. muta*, esta espécie possui duas subespécies, são popularmente conhecidas como surucucu ou surucucu pico de jaca (Figura 7D). São encontradas na floresta Amazônica, mata atlântica e algumas matas úmidas do Nordeste, com cerca de 2% dos acidentes. No Brasil, existem 18 espécies pertencentes ao gênero *Micrurus* distribuídas em partes das regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste e Norte. Seu padrão de coloração é bem característico e são conhecidas popularmente como coral ou coral-verdadeira (Figura 7E). (PINHO & PEREIRA, 2001).



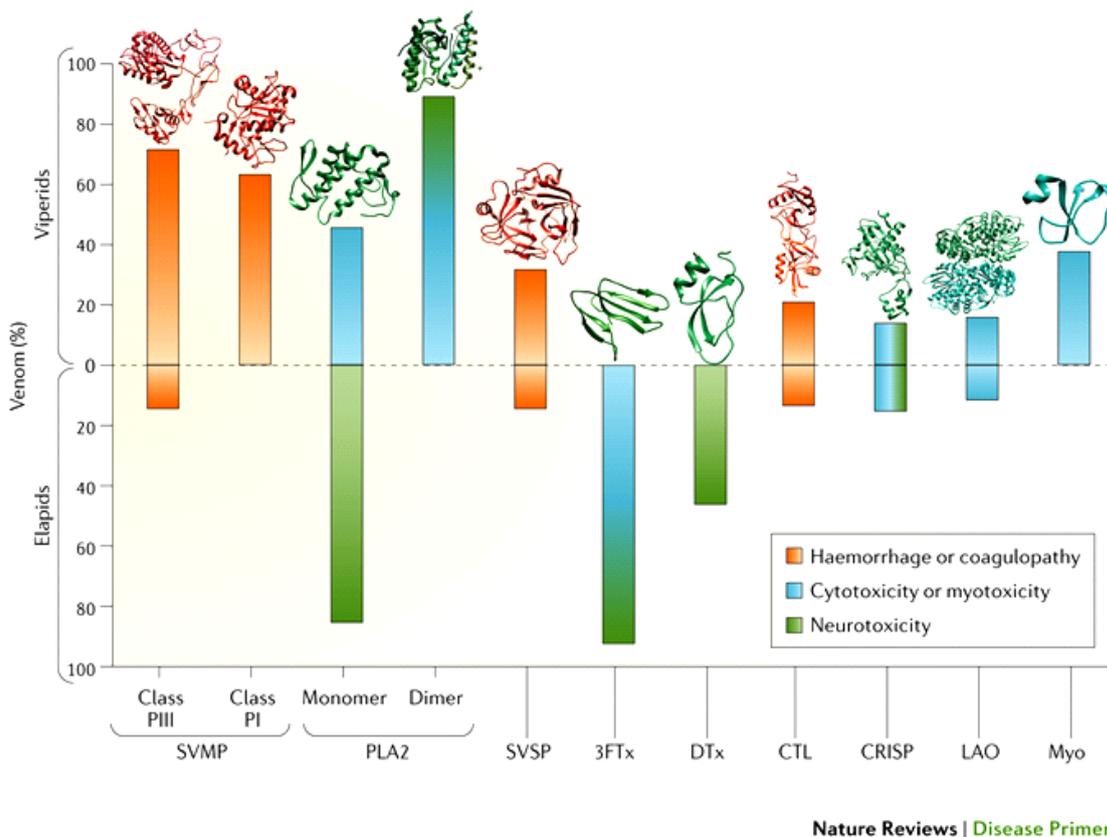
**Figura 7:** (A) *Bothrops jararaca* (Jararaca); (B) *Bothrops jararacussu* (Jararacussu ou Jararacuçu); (C) *Crotalus durissus* (Cascavel); (D) *Lachesis muta* (Surucucu) e (E) *Micrurus* sp (Coral verdadeira). Fonte: <http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/serpentes-venenosas.html>

## 1.2 COMPOSIÇÃO DO VENENO E QUADRO CLÍNICO

O veneno da serpente é constituído por uma combinação complexa de proteínas. Cerca de 95-99% dos venenos é composto por material proteico com ou sem atividade enzimática (metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A<sub>2</sub>, fosfodiesterases, colinesterases, hialuronidasas, NAD nucleosidasas, L-aminoácido oxidases, catalases, ATPases, aminotransferases e β-glucosaminidasas, cardiotoxinas, citotoxinas, fatores de crescimento vascular e neural, lectinas tipo-C e peptídeos desintegrinas); e cerca de 1% constituído por material não proteico, como aminoácidos, carboidratos, lipídeos, citrato, cálcio, cobre, ferro, fósforo, potássio, magnésio, sódio, zinco. Sendo que, o material proteico é responsável pelos diversos efeitos tóxicos causados à vítima, podendo levar a óbito (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

O crescente interesse em diferentes aspectos da biologia do veneno catalisou o desenvolvimento de metodologias '-ômicas' destinadas à caracterização qualitativa e quantitativa das toxinas do veneno, incluindo a proteômica dos venenos (ou seja, venômica). Em particular, a combinação de transcriptômica de próxima geração e fluxos de trabalho proteômicos demonstrou capacidades incomparáveis para caracterização de venenos com detalhes sem precedentes. A distribuição relativa dos principais tipos de componentes tóxicos nos venenos de viperídeos e elapídeos está resumida na figura 8.

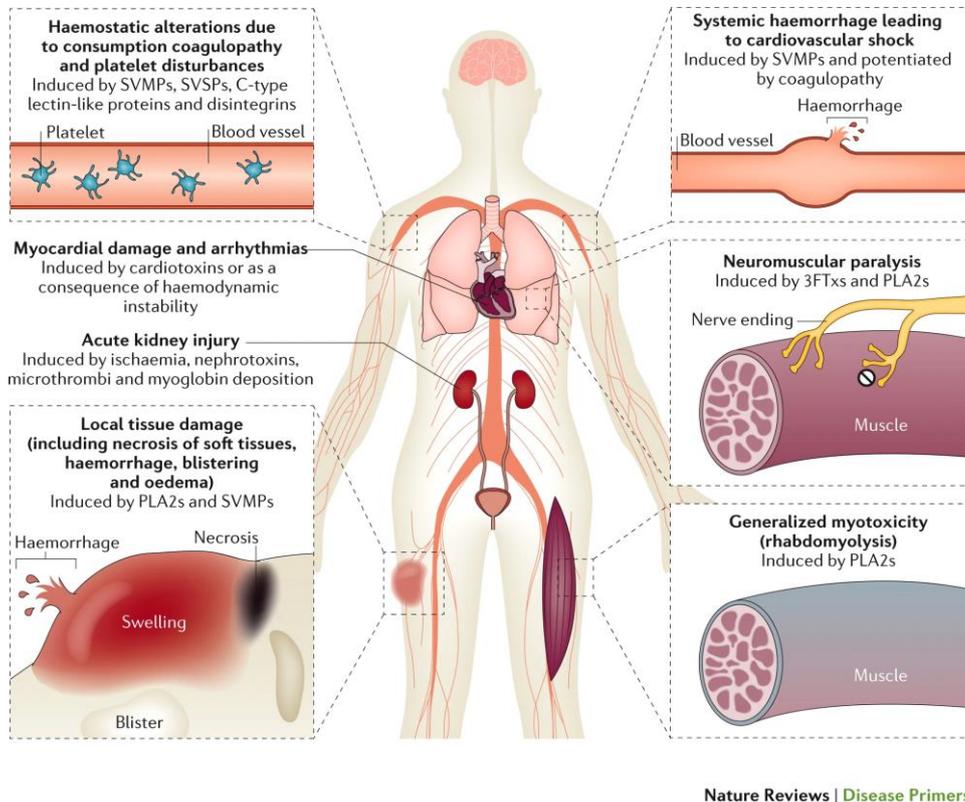
A figura 8 destaca as faixas de níveis de proteína (expressas como % do proteoma total do veneno) e a distribuição distinta das famílias de toxinas mais abundantes em diferentes venenos de espécies de serpentes das famílias Viperidae (subfamílias Viperinae e Crotalinae) e Elapidae (subfamílias Elapinae e Hydrophiinae). As barras são codificadas por cores de acordo com as atividades biológicas mais relevantes da família de toxinas correspondente (VONK *et al.*, 2013). Os gradientes de cor indicam a dependência da concentração do efeito biológico (mesma cor) ou efeitos diferentes (múltiplas cores; isto é, algumas toxinas podem exercer um efeito em doses baixas e outro efeito em doses elevadas). A estrutura cristalográfica ou de ressonância magnética nuclear de alguns membros de cada família de proteínas também estão mostradas nesta figura.



**Figura 8:** Distribuição relativa de componentes tóxicos dos venenos elapídicos e viperídicos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). 3FTx, toxina de três dedos (ID de acesso ao Banco de Dados de Proteínas (PDB ID): 1IJC); CRISP, proteína secretora rica em cisteína (PDB ID: 3MZ8); CTL, proteína tipo lectina tipo C (PDB ID: 1IXX); DTx, dendrotoxina (PDB ID: 1DTX); LAO, L-aminoácido oxidase (PDB ID: 2IID); Myo, miotoxina de baixa massa molecular (PDB ID: 4GV5); PLA<sub>2</sub>, fosfolipase A<sub>2</sub> (PDB ID: 1TGM para o monômero e PDB ID: 3ROL para o dímero); SVMP, metaloproteínase de veneno de serpente (PDB ID: 3DSL para classe PIII e PDB ID: 1ND1 para classe PI); SVSP, serina proteínase de veneno de serpente (PDB ID: 1OP0).

Tais proteínas enzimáticas presentes no veneno da serpente desencadeiam diferentes atividades tóxicas a vítima, podendo ser efeitos locais ou sistêmicos. As metaloproteases são as enzimas responsáveis por efeitos como hemorragia, mionecrose, degradação da matriz extracelular, bolhas, dor, edema, choque hipovolêmico, nefrotoxicidade e coagulopatia. As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são responsáveis por provocar miotoxicidade local e sistêmica, dor, inflamação, danos aos vasos linfáticos, edema, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e hemólise, e as

serinoproteases causam efeitos como coagulopatia, edema e hipotensão (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SECRETARIA DA SAÚDE, 2021).



**Figura 9:** Efeitos tóxicos dos venenos de serpentes. 3FTx, toxina de três dedos; PLA2, fosfolipase A2; SVMP, metaloproteinase de veneno de serpente; SVSP, serina proteinase de veneno de serpente (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Os venenos apresentam uma variedade abrangente de atividades tóxicas no organismo, sendo que as ações prejudiciais predominantes variam de acordo com a composição específica do veneno. Os venenos elapídeos e alguns venenos viperídeos ocasionam paralisia neuromuscular, enquanto a maioria dos venenos de viperídeos e alguns venenos de elapídeos geram danos locais proeminentes aos tecidos. Os venenos de viperídeos provocam hemorragia sistêmica, que, aliada ao aumento da permeabilidade vascular, pode resultar em choque cardiovascular. Tanto viperídeos quanto alguns elapídeos e colubrídeos sem presas frontais atuam em diversos estágios da cascata de coagulação e nas plaquetas, impactando a hemostasia. Alguns venenos

causam uma destruição muscular generalizada, enquanto a lesão renal aguda frequentemente se desenvolve em casos de envenenamento, devido a uma patogênese multifatorial (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; WARRELL, 2010).

O acidente botrópico caracteriza-se por manifestações clínicas com efeitos locais no membro picado, como dor irradiada imediata; inchaço sensível que se estende rapidamente com eritema inflamatório quente, que geralmente se torna evidente duas horas após a picada; sinais de linfangite (inflamação dos vasos linfáticos, que se apresenta como linhas vermelhas na pele); sangramento prolongado na ferida perfurada pelas presas; bolhas; equimose (hematomas); aumento sensível dos linfonodos regionais; e necrose tecidual/muscular e infecção secundária (celulite ou abscesso) (WARRELL, 2004; AYRES & WARRELL, 2020). Os efeitos sistêmicos incluem síncope precoce e colapso com perda transitória de visão e consciência; hipotensão e choque; taquiarritmia cardíaca ou bradiarritmia; diátese hemorrágica grave, sangramento sistêmico espontâneo do nariz, gengivas, trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário e locais de trauma recente ou feridas em cicatrização, e hemorragias subaracnóides, cerebrais (SANT'ANA MALAQUE & GUTIÉRREZ, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

As manifestações clínicas locais e sistêmicas presentes no acidente laquétrico são extremamente parecidas com o acidente botrópico, diferindo as alterações vagas como náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, hipotensão e choque (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; SECRETARIA DA SAÚDE, 2021).

Nos acidentes crotálicos, predominam as manifestações sistêmicas; no entanto, também são observadas algumas manifestações locais, tais como dor, edema, eritema e parestesia no local da picada. Entre os efeitos sistêmicos, ocorrem manifestações neuroparalíticas (neurotóxicas), que se iniciam com ptose palpebral, turvação visual e oftalmoplegia, seguidas de ptose mandibular e sialorreia. A paralisia muscular pode progredir para a paralisia respiratória, além de ser possível a ocorrência de gengivorragia e hemorragias. Ocorre mialgia generalizada e escurecimento da cor da urina, podendo avançar para insuficiência renal aguda (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; JORGE E RIBEIRO, 1990; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Já nos acidentes elapídicos, as manifestações locais são imperceptíveis, podendo haver dor e parestesia no local da mordida da serpente. Porém, as manifestações sistêmicas são neurotóxicas e assemelham-se aos efeitos sistêmicos do acidente crotálico. Entretanto, predomina o bloqueio neuromuscular causando a paralisia muscular (JORGE E RIBEIRO, 1990; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Na figura 10 podemos observar alguns efeitos clínicos gerais decorrentes do envenenamento por serpentes: (a) inchaço e bolhas após acidente ofídico com serpente *B. jararaca*; (b) inchaço, bolhas, gangrena e equimoses; (c) gengivorragia; (d) quemose conjuntival; (e) ptose palpebral bilateral; (f) paralisia dos músculos oculares; Ambos, (e) e (f) acidentados com envenenamento de serpente da família Elapidae; (g) necrose extensa da pele e tecido subcutâneo após uma mordida por serpente da família Elapidae (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).



**Figura 10.** Efeito clínico causado pelo envenenamento por serpentes. (a) inchaço e bolhas; (b) inchaço, bolhas, gangrena e equimoses; (c) gengivorragia; (d) quemose conjuntival; (e) ptose palpebral bilateral; (f) paralisia dos músculos oculares; (g) necrose extensa da pele e tecido subcutâneo (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

### 1.3 TRATAMENTO

Os antivenenos de serpentes, conhecidos no Brasil também como “soros antiofídicos” são tratamentos eficazes para prevenção ao óbito e reverterem a maioria dos efeitos tóxicos do envenenamento, e estão incluídos na “Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde”. O antiveneno é o único tratamento atual preconizado pelo Ministério da Saúde (WHO, 2017).

Em 1894, Phisalix e Bertrand, do Museu Nacional de História Natural de Paris, foram os pioneiros a utilizar veneno tratado para imunização. Um ano depois, em 1895, Albert Calmette do Instituto Pasteur de Paris, utilizou o soro de um cavalo imunizado como veneno de serpentes para o tratamento do envenenamento ofídico. A partir de 1898, Calmette começou a comercializar estes equinos imunizados para o tratamento por envenenamento de serpentes. No Brasil, a primeira produção em larga escala de “soro antiofídico” ocorreu em 1911 pelo Instituto Vital Brazil (PUCCA *et al.*, 2019; LALLOO E THEAKSTON, 2003).

Atualmente no Brasil, os antivenenos são fabricados em quatro grandes centros produtores: Instituto Vital Brazil (Niterói – Rio de Janeiro), Instituto Butantan (Butantã – São Paulo), Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte – Minas Gerais) e Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (Piraquara – Paraná) (ALFOB/CFF, 2019).

O antiveneno compreende imunoglobulinas (Igs) concentradas de cavalos, ovelhas ou outros grandes animais domesticados, como camelos, que foram hiperimunizados com um ou mais venenos durante meses a anos. Em todo o mundo, a maioria dos fabricantes de antivenenos refina toda a IgG extraída do plasma dos animais por digestão enzimática com pepsina para produzir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, sob a suposição de que a remoção da porção Fc do fragmento de ligação ao antígeno (Fab) reduz o risco de reações adversas nos pacientes. Outros fabricantes utilizam papaína para produzir fragmentos Fab menores para melhorar a segurança e aumentar a velocidade de distribuição por todo o corpo, mas com a desvantagem da rápida depuração renal do antiveneno, de modo que o envenenamento recorrente se torna um problema. Alguns antivenenos compreendem moléculas inteiras de IgG que são geralmente purificadas por precipitação com ácido caprílico (WHO, 2013).

Ao longo dos anos, a produção do antiveneno sofreu algumas mudanças no processo de fabricação, além disto, produtores mundiais adotam técnicas diferentes, porém dentro de protocolos aceitáveis. A princípio, para precipitar a IgG da fração do soro era utilizado sulfato de amônio. Com modificações, incluiu-se a clivagem da molécula de IgG com pepsina para produzir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, e mais recentemente, fragmento Fab monovalente preparado por digestão de papaína. A fim de purificar ainda mais os antivenenos, atualmente se utiliza o ácido caprílico para precipitar todas as proteínas não-IgG do soro hiperimune, além de cromatografia líquida de troca iônica ou afinidade também podem ser utilizadas neste processo (AL-ABDULLA *et al.*, 2003; LALLOO E THEAKSTON, 2003).

Em 2008, para padronizar a produção, o controle e a regulação na fabricação dos antivenenos, a OMS desenvolveu o “*Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins*”, servindo como guia para as autoridades reguladoras nacionais, podendo assim seguir as “Boas Práticas de Fabricação”, acompanhando as diretrizes descritas pela OMS para fabricação, avaliação clínica e pré-clínica dos antivenenos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2011).

Existem quatro principais antivenenos que são utilizados no tratamento por envenenamento por serpentes, e estes são escolhidos a depender da espécie da serpente envolvida no acidente ofídico. Para os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* é utilizado o soro antibotrópico (SAB), para o gênero *Crotalus* é utilizado o soro anticrotálico (SAC), para serpentes do gênero *Lachesis* é aplicado o soro antilaquétrico (SAL) e para o gênero *Micrurus* ou *Leptomicrurus* é administrado o soro antielapídico (SAE). Existem também associações do veneno, no caso de um possível acidente botrópico, onde o paciente não conseguiu definir qual serpente o atacou ou na falta do antiveneno específico, poderão utilizar as associações como: soro antibotrópico-crotálico (SABC) ou antibotrópicolaquétrico (SABL). Todos os soros são administrados por via intravenosa, e a quantidade de ampolas a ser administrada dependerá das manifestações clínicas locais e sistêmicas, classificadas entre leve, moderada e grave (Quadro 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; FUNASA, 2001).

No Brasil, o soro antibotrópico é produzido a partir da hiperimunização de cavalos que são inoculados com veneno de cinco espécies diferentes de serpentes do

gênero *Bothrops*: *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. alternatus* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%). Esta mistura foi estabelecida a partir de estudos que apresentaram a frequência dos acidentes ofídicos, a distribuição de espécies e a capacidade dos venenos em provocar uma resposta imune em cavalos. Esta mistura promove o questionamento quanto à eficácia da utilização deste soro em acidentes com outras espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, embora todas as serpentes pertençam a família Viperidae, existem propriedades no veneno de cada espécie que podem interferir na eficácia da neutralização proporcionada pelo soro antiofídico (FURTADO *et al.*, 2010).

**Quadro 2:** Número de ampolas de antiveneno específico indicado para cada tipo e gravidade do acidente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Acidente	Antiveneno	Gravidade	Nº de ampolas
<b>Botrópico</b>	SAB <sup>b</sup> , SABL <sup>c</sup> ou SABC <sup>d</sup>	Leve: quadro local discreto, sangramento discreto em pele ou mucosas; pode haver apenas distúrbio na coagulação.	2 a 4
		Moderado: edema e equimose evidentes, sangramento sem comprometimento do estado geral; pode haver distúrbio na coagulação.	4 a 8
		Grave: alterações locais intensas, hemorragia grave, hipotensão/choque, insuficiência renal, anúria; pode haver distúrbio na coagulação.	12
<b>Laquéptico<sup>a</sup></b>	SABL	Moderado: quadro local presente; pode haver sangramentos, sem manifestações vagais.	10
		Grave: quadro local intenso, hemorragia intensa, com manifestações vagais.	20
<b>Crotálico</b>	SAC <sup>e</sup> ou SABC	Leve: alterações neuromusculares; sem mialgia, escurecimento da urina ou oligúria.	5
		Moderado: alterações neuromusculares evidentes, mialgia e mioglobinúria discretas.	10
		Grave: alterações neuromusculares evidentes, mialgia e mioglobinúria intensas, oligúria.	20
<b>Elapídico</b>	SAEla <sup>f</sup>	Considerar todos graves pelo risco de insuficiência respiratória.	10

<sup>a</sup> Devido à potencial gravidade do acidente laquético, são considerados clinicamente moderados ou graves, não havendo casos leves.

<sup>b</sup> SAB = Soro antibotrópico (pentavalente);

<sup>c</sup> SABL = Soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquético;

<sup>d</sup> SABC = Soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotálico;

<sup>e</sup> SAC = Soro anticrotálico;

<sup>f</sup> SAEIa = Soro antielapídico (bivalente).

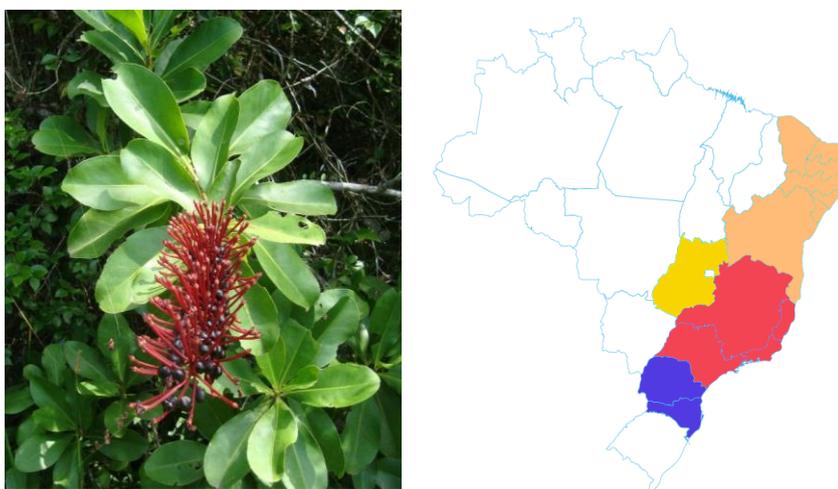
A soroterapia é extremamente eficaz na prevenção ao óbito, mas ineficaz na neutralização dos efeitos locais, e essa ineficácia pode evoluir à amputação ou deformação do membro onde ocorre a mordida da serpente. Além disto, existem outras desvantagens associadas à soroterapia, como: custo elevado de produção e pode gerar efeitos adversos, desde uma simples febre até reações anafiláticas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Por isso, a procura por novas moléculas e/ou tratamentos se torna importante como método alternativo ou complementar à soroterapia para neutralizar principalmente os efeitos tóxicos locais causados pelos venenos das serpentes.

#### **1.4 *Schwartzia brasiliensis***

Os produtos naturais são alvos de pesquisas para o tratamento do envenenamento por serpentes, principalmente as plantas, que são amplamente utilizadas no tratamento do acidente ofídico, devido a medicina tradicional (MALANGE *et al.*, 2019; GIOVANNINI E HOWES, 2017).

Estudos etnobotânicos da planta da espécie *Tabebuia aurea* mostram seu uso como anti-inflamatório e no tratamento para o envenenamento por serpentes. O tratamento com o extrato hidroetanólico desta espécie foi avaliado a partir da avaliação das atividades inflamatórias, hemorrágicas e miotóxicas induzidas pelo veneno da serpente *B. neuwiedi* em camundongos. Os estudos concluíram que as atividades do extrato avaliadas no trabalho justificam o uso popular da *T. aurea* em situações inflamatórias no tratamento do envenenamento por serpentes (REIS *et al.*, 2014).

A *Schwartzia brasiliensis* (Choisy) Bedell ex Gir.-Cañas pertence à família Marcgraviaceae, é uma planta trepadeira endêmica do Brasil conhecida popularmente como “agarra-pé”, distribuída geograficamente pelo Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul do país (Figura 11) (DRESSLER, 2020). Folhas coriáceas exibem uma nervação distintiva na face superior. A inflorescência, que mede entre 21-32 cm é composta por 40-83 flores vermelhas, acompanhadas por nectários extraflorais em formato de copo, que produzem néctar continuamente e em abundância. Geralmente, essas flores surgem de outubro a janeiro, atraindo principalmente beija-flores e insetos. Os frutos, pequenos e de tonalidade vinho quando maduros, aparecem de janeiro a março. No contexto paisagístico, essa planta é frequentemente utilizada apoiada em suportes ou muros (GIRALDO-CAÑAS, 2004; AAJB, 2020).



**Figura 11:** À esquerda: planta da espécie *Schwartzia brasiliensis*. À direita: distribuição geográfica pelo Brasil. Fonte: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB103323>

Dados da literatura mostram que a espécie *S. brasiliensis* é rica em flavonóides, taninos e compostos fenólicos. Extratos desta espécie apresentaram propriedades anti-inflamatória, analgésica e tripanocida, a partir de análises de suas características químicas e biológicas. Na medicina popular, *S. brasiliensis* é utilizado como chá para tratamento de doenças cardíacas, mas não há validação científica para comprovar eficácia ou segurança. Também foi testado seu potencial fitoterápico para o

tratamento da dengue (FIALHO *et al.*, 2016). Por outro lado, na literatura científica e nem na medicina popular, o efeito antiveneno do *S. brasiliensis* nunca foi descrito.

As espécies do gênero *S. brasiliensis* são utilizadas como ornamentais, mas além desta característica, os estudos selecionados demonstram o potencial medicinal das espécies. A *S. brasiliensis* foi listada dentre as 389 espécies de plantas utilizadas por indígenas e comunidades rurais no Nordeste do Brasil, para fins medicinais. Na Caatinga, a árvore é de ocorrência espontânea e as folhas e flores são utilizadas para o tratamento de problemas cardíacos (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

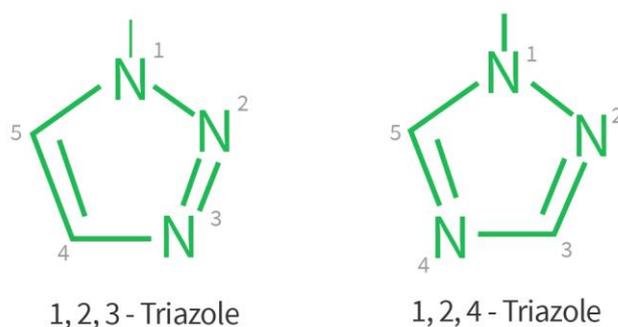
Neste contexto, foi determinado o potencial analgésico do extrato hexânico bruto de folhas, avaliado em 80%, assim como os extratos aquosos de folha e caule, que demonstraram atividade analgésica avaliada em 90 e 77,5%, respectivamente (ROCHA, 2002). No mesmo estudo foi revelada a presença de substâncias apolares no extrato hexânico das folhas, uma série homóloga de 10 hidrocarbonetos, com os constituintes majoritários sendo esteroides, como estigmasterol e uma mistura de 4 triterpenos pentacíclicos, identificados como lupeol,  $\beta$ -amirina, viminalol e germanicol. Além disso, o extrato etanólico bruto das folhas de *S. brasiliensis*, coletadas no Estado do Rio de Janeiro, apresentou atividade antifúngica por método de difusão para *Chalara paradoxa* (De Seynes) Moreau, com halo de 12 mm (SALES *et al.*, 2016). Fialho *et al.* (2016) ao investigarem o extrato bruto etanólico das folhas e as frações em diclorometano, acetato de etila e butanol, constataram que o extrato bruto de *S. brasiliensis* apresentou o melhor efeito antiviral *in vitro* contra o vírus da dengue (DENV)-2 e regulação negativa da secreção de TNF- $\alpha$  (tumor necrosis fator – Fator de necrose tumoral), IL-6 (interleucina 6), IL-10 (interleucina 10) e IFN- $\alpha$  (interferon alfa), carga viral antigênica celular e redução da proteína NS1 secretada (proteína não estrutural do vírus da dengue); enquanto que a fração diclorometano apresentou um efeito imunomodulador no processo inflamatório.

## **1.5 DERIVADOS 1,2,3-TRIAZOL**

Os produtos naturais são amplamente investigados para o tratamento de muitas doenças, assim como para o tratamento no envenenamento por serpentes (DA SILVA

*et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2018). Além disso, moléculas obtidas por síntese orgânica também são muito pesquisadas (DE ALVARENGA *et al.*, 2011; STRAUCH *et al.*, 2019; CASTAÑEDA *et al.*, 2019).

Os triazóis são compostos heterocíclicos com um anel de cinco membros consistindo de dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio (Figura 12). Entre estes, existem dois isômeros de anel, 1,2,3-triazóis e 1,2,4-triazóis (BOZOROV *et al.*, 2019), sendo que sua seletividade na obtenção destes compostos depende da metodologia empregada.



**Figura 12:** Estrutura do 1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol

A primeira droga sintetizada usando este núcleo foi Ribavirina usada no combate aos vírus da hepatite (FERREIRA *et al.*, 2014). Através dos compostos desta classe é possível descobrir ainda mais potencial de criação para esse núcleo, pois pela adição de diferentes substituintes (R, R1 e R3) é viável a síntese de diferentes estruturas à partir do 1,2,3-triazol (Figura 13). Existem mais benefícios do que se conhece atualmente (KHARB *et al.*, 2011).



**Figura 13:** Estrutura do 1,2,3-triazol evidenciando a possível adição no anel visando a síntese de diferentes compostos orgânicos.

Os triazóis são os principais antifúngicos utilizados no tratamento e prevenção de micoses sistêmicas (LASS-FLÖRL, 2011). Os derivados triazóis são amplamente investigados para o tratamento de diversas doenças, como: anticancerígeno (LAAMARI *et al.*, 2021), antiviral (SHADYRO *et al.*, 1999), antituberculose (KERI *et al.*, 2015), antifúngico (TERRA *et al.*, 2018), anticoagulante e antiplaquetário (MOURA *et al.*, 2016).

Triazóis são compostos heteroaromáticos com 6 elétrons  $\pi$ . Em outras palavras, segue a lei de Hückel para compostos aromáticos, na qual dois átomos de carbono se combinam com nitrogênio para criar um elétron. Cada terceiro nitrogênio adiciona dois elétrons para formar um sexteto aromático (MELO *et al.*, 2006; EICHER *et al.*, 2003). Atualmente não há relatos desta classe de produto sendo fornecida por recursos naturais, ou seja, nenhum organismo vivo é capaz de sintetizar através do metabolismo, o triazol. Alguns trabalhos investigaram vários desses 1,2,3-triazóis com ação bactericida. Sendo que, alguns destes compostos sintéticos foram mais eficientes do que a própria penicilina e com o conveniente de serem resistentes as  $\beta$ -lactamases, enzima produzida pela bactéria e responsável pelos mecanismos de resistência a essa classe de fármaco (MELO *et al.*, 2006).

Por apresentarem essa conformação estrutural, hoje temos uma variedade de medicamentos disponíveis na terapia clínica. Esses medicamentos abrangem várias classes terapêuticas, incluindo antifúngicos, anticonvulsivantes e hipnóticos, relaxantes musculares e ansiolíticos, agentes anti-encefalopatia, antiplaquetários, antidepressivos, anticancerígenos e antivirais. Além disso, alguns fungicidas comerciais usados na agricultura também contêm essa estrutura de triazol, como o protioconazol, triadimefon, metconazol, propiconazol, tebuconazol, epoxiconazol, triadimenol e ciproconazol (RUSSEL, 2005; ZHOU & WANG, 2012; PEYTON *et al.*, 2015).

Resultados do nosso grupo de pesquisa do LAVENOTOXI já evidenciaram a ação inibitória de vários derivados sintéticos do 1,2,3-triazol sobre algumas atividades tóxicas causadas por venenos de diferentes espécies de serpentes (CAMPOS *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2013). Dessa forma, também é importante a síntese de uma ampla gama de derivados sintéticos do 1,2,3-triazol para que dessa forma um estudo de prospecção antiveneno seja realizado, aumentando o rol de moléculas com potencial antiveneno.

## **2. OBJETIVO**

## 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de neutralização do extrato aquoso da planta *Schwartzia brasiliensis* e de 10 derivados 1,2,3-triazol contra atividades tóxicas *in vitro*, *in vivo* e *in silico* causadas pelo veneno das serpentes *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade inibitória do extrato aquoso da planta *S. brasiliensis* contra as atividades tóxicas *in vitro* (coagulante, proteolítica e hemolítica) causadas pelo veneno das serpentes *B. jararaca* e *B. jararacussu*;

- Avaliar a capacidade inibitória do extrato aquoso da planta *S. brasiliensis* contra as atividades tóxicas *in vivo* (hemorrágica, edematogênica e letal) causadas pelo veneno das serpentes *B. jararaca* e *B. jararacussu*;

- Analisar o potencial inibitório de 10 derivados do 1,2,3-triazol contra as atividades tóxicas *in vitro* (coagulante, proteolítica e hemolítica) causadas pelo veneno da serpente *B. jararaca*;

- Analisar o potencial inibitório de 10 derivados do 1,2,3-triazol contra as atividades tóxicas *in vivo* (hemorrágica, edematogênica e letal) causadas pelo veneno da serpente *B. jararaca*;

- Investigar através de técnica *in silico* os parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) dos 10 derivados do 1,2,3-triazol.

# **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. OBTENÇÃO DO VENENO DAS SERPENTES**

O veneno bruto de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi gentilmente cedido pelo Prof. Eladio Flores Sanchez, da Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte/Minas Gerais) e mantido a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento dos ensaios biológicos. O veneno foi diluído em salina 0,15 M para a realização das atividades tóxicas *in vitro* e *in vivo*. A coleta de veneno da serpente foi acompanhada sob autorização do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), processo número A39CD4E.

### **3.2. OBTENÇÃO DOS ANIMAIS**

Os camundongos suíços ou Balb/c (18-20 g) foram obtidos do Núcleo de Animais de Laboratório (NAL) da Universidade Federal Fluminense, foram alojados sob temperatura ( $24 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e condições de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) controlados. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFF, protocolos número 508 e 646, que estão de acordo com as diretrizes da Comissão Nacional de Bem-Estar Animal (COBEA).

### **3.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA PLANTA *Schwartzia brasiliensis***

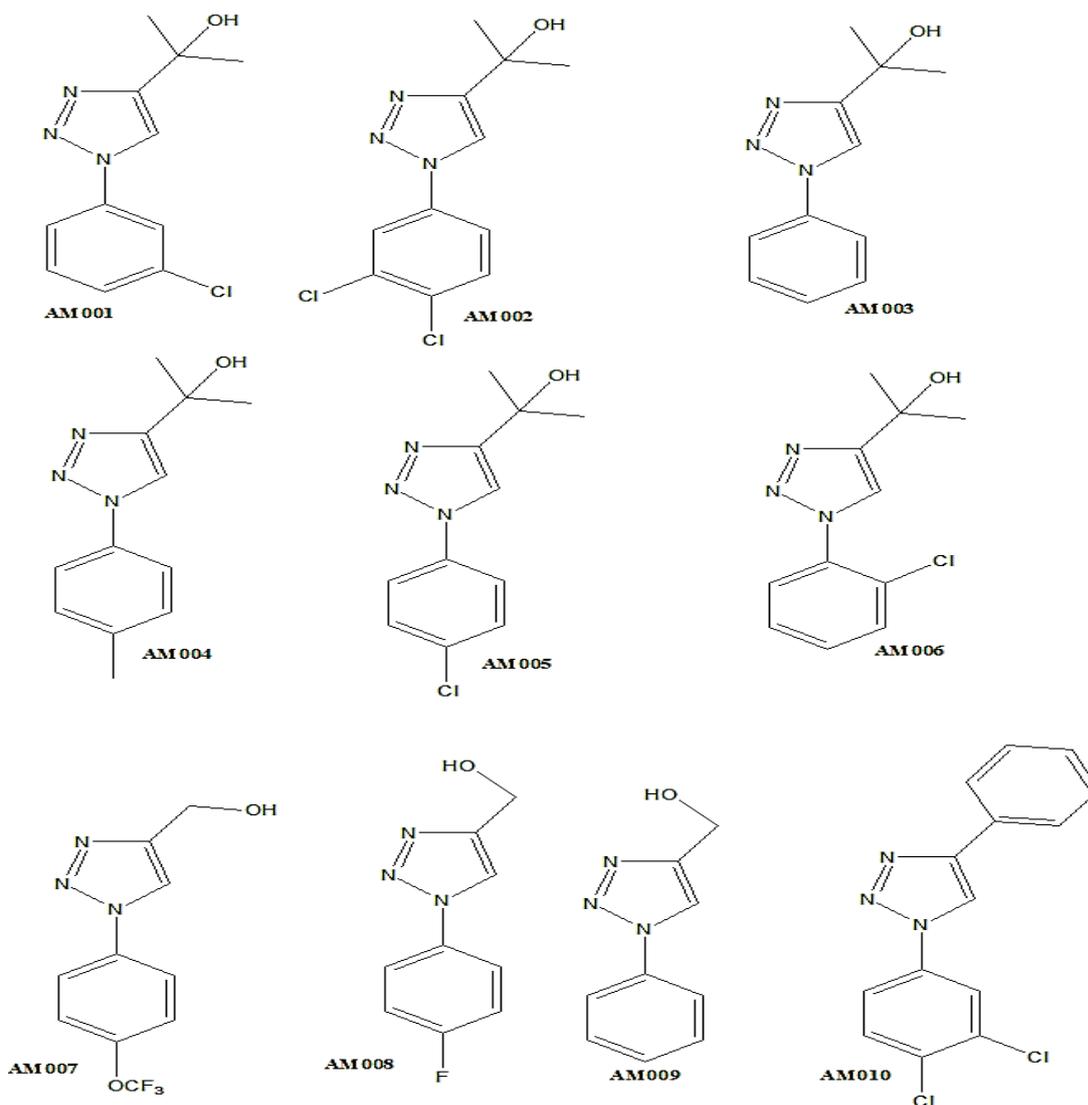
O extrato aquoso da planta *S. brasiliensis* foi gentilmente cedido pela Dra. Maria Raquel Figueiredo do Laboratório de Química de Produtos Naturais, FIOCRUZ; e pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan do Núcleo de Produtos Naturais (NPPN), UFRJ. O material foi identificado pelo Dra. Geisa Lauro Ferreira e uma espécie foi depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, sob número 152.017. A coleta de material vegetal foi autorizada pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o número AB5D582.

As folhas da espécie *S. brasiliensis* foram coletadas em abril de 2016 na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), localizada na cidade de Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. As folhas de *S. brasiliensis* foram secas em estufa com circulação de ar a

40°C. O material seco (975 g) foi reduzido a pequenos fragmentos e extraído à temperatura ambiente com etanol por 5 dias. O solvente foi removido sob baixa pressão rendendo 170 g do extrato seco. Parte de este extrato foi solubilizado em metanol:água (1:9, v/v) e fracionado por extração líquido-líquido usando solventes de polaridades crescentes sequencialmente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. As frações resultantes e o resíduo aquoso foram concentrados sob pressão reduzida e liofilizado. As amostras foram armazenadas a -20 °C, até testar. O extrato da *S. brasiliensis* foi dissolvido em água destilada para realização dos ensaios tóxico-biológicos. O procedimento está descrito em de Souza *et al.* (2021).

### **3.4. OBTENÇÃO DOS DERIVADOS SINTÉTICOS 1,2,3-TRIAZOL**

Os derivados 1,2,3-triazol foram sintetizados quimicamente e gentilmente cedidos pela Dra. Sabrina Baptista Ferreira do Laboratório de Síntese Orgânica e Prospecção Biológica, IQ/UFRJ e pelo Prof. Dr. Vitor Francisco Ferreira do Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada, Faculdade de Farmácia, UFF. Os derivados designados de AM001, AM002, AM003, AM004, AM005, AM006, AM007, AM008, AM009 e AM010 foram dissolvidos em 50% de dimetilsulfóxido (DMSO) para realização dos ensaios tóxico-biológicos. A estrutura química dos derivados sintéticos está mostrada na figura 14.



**Figura 14:** Estrutura química dos 10 derivados sintéticos (AM001 a AM010) desenhadas no editor ChemDraw Ultra 7.0.

### 3.5. ATIVIDADE COAGULANTE DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu*

Esta atividade é comumente empregada para avaliar a participação de serinoproteases e metaloproteinasas, que estão presentes em abundância nos venenos de serpentes. A atividade coagulante do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi realizada utilizando-se “pool” de plasma humano, gentilmente cedido pelo banco de sangue do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) da Universidade Federal Fluminense. 200  $\mu$ L de plasma diluído em salina na proporção de 1:1 (v/v)

foram mantidos a 37 °C por 1 min e em seguida a reação foi iniciada pela adição de diferentes concentrações do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*. O tempo de coagulação foi monitorado por turbidimetria, em segundos a 37 °C, utilizando-se um coagulômetro digital (Amelung KC4, Labcom). Uma unidade arbitrária foi chamada de concentração mínima coagulante (CMC), que foi a quantidade de veneno (µg/mL) capaz de coagular o plasma em cerca de 60 segundos. Esta unidade arbitrária é amplamente usada na área da Toxinologia.

### **3.5.1. EFEITO DO EXTRATO OU DERIVADOS SINTÉTICOS NA ATIVIDADE COAGULANTE DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu***

O efeito do extrato aquoso da planta *S. brasiliensis* ou dos 10 derivados foi avaliado incubando-os com 1 CMC do veneno de *B. jararaca* (37 µg/mL) e *B. jararacussu* (56 µg/mL) por 30 min a 25 °C, na proporção de 1:5 ou 1:10 (veneno:extrato ou derivado, p/p). Em seguida, uma alíquota desta mistura foi adicionada ao plasma e o tempo de coagulação foi comparado com aquele obtido no controle positivo, que continha apenas o veneno incubado com solvente (salina ou DMSO). Em paralelo, os derivados sintéticos ou extrato da planta na ausência do veneno foram incubados com salina ou DMSO, e adicionados ao plasma (controle negativo) e a coagulação foi monitorada, como descrito anteriormente.

### **3.6. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu***

Esta atividade é comumente empregada para avaliar a participação de proteases, que estão presentes em abundância nos venenos de serpentes. A atividade proteolítica do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi determinada usando-se azocaseína como substrato (GARCIA *et al.*, 1978). Alíquotas dos venenos foram incubadas com 0,2% azocaseína (p/v) em tampão 200 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,8 por 90 min a 37 °C e o volume final da reação ajustado com salina para 0,8 mL. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 0,4 mL TCA a 10% e os tubos foram

centrifugados a 12.000 rpm por 3 min. Após, 1,0 mL do sobrenadante foi retirado e adicionado outro tubo contendo 0,5 mL NaOH 2N. A atividade enzimática foi quantificada em absorbância (A) em um comprimento de onda de 420 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Biospec-22. A concentração do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* que foi capaz de produzir uma variação de 0,2 em A 420 nm (que representa cerca de 70-80% da atividade proteolítica do veneno) foi definida como, concentração efetiva (CE). Esta CE também foi criada como uma unidade arbitrária e amplamente usada na área de Toxinologia.

### **3.6.1. EFEITO DO EXTRATO OU DERIVADOS SINTÉTICOS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu***

O efeito do extrato aquoso de *S. brasiliensis* ou dos 10 derivados 1,2,3-triazol foi avaliado através da incubação destes com 1 CE do veneno de *B. jararaca* (4,8 µg/mL) e *B. jararacussu* (7,8 µg/mL) por 30 min a 25 °C, na proporção de 1:5 ou 1:10 (veneno:extrato ou derivado, p/p). Em seguida, alíquotas desta mistura foram adicionadas ao meio reacional (contendo azocaseína) e a atividade proteolítica foi realizada como descrito anteriormente. O grupo controle positivo continha veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* incubado com salina ou DMSO, na ausência da planta ou derivado; enquanto que o controle negativo continha apenas o extrato da planta ou derivados, sem o veneno.

### **3.7. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO VENENO DE *B. jararaca***

Esta atividade é comumente empregada para avaliar a participação de fosfolipases do tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que estão presentes em venenos de serpentes. A atividade hemolítica do veneno de *B. jararaca* foi realizada através do método de hemólise indireta (FULY *et al.*, 1997), usando eritrócitos humanos e gema de ovo de galinha como substrato. A gema foi preparada diluindo-se com volume igual de salina, centrifugada a 12.000 rpm por 60 min a 10 °C e utilizando-se apenas o sobrenadante, que contém os fosfolipídios que são o substrato para as PLA<sub>2</sub> de venenos de serpentes.

Inicialmente, para realizar a atividade hemolítica do veneno de *B. jararaca* foi adicionado 20 µL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM e 50 µL de gema, em um volume final de 250 µL. Após 15 min a 37 °C, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 50 µL de EDTA (50 mM). Em seguida, 3,2 mL de salina foram adicionados aos tubos e 1,3 mL de uma suspensão de hemácias humanas lavadas (2%, v/v) e os tubos ficaram em banho-maria a 37 °C por 60min. Os tubos foram centrifugados a 2.200 rpm por 8 min a 25 °C, e a lisolecitina gerada enzimaticamente foi quantificada pela liberação de hemoglobina das hemácias, utilizando-os o espectrofotômetro Biospectro SP-22 na absorbância de 578 nm. Cem por cento (100%) de lise das hemácias foram obtidos através da adição de água destilada e comparada com o percentual de hemólise obtido nos tubos que continham apenas o veneno. A concentração do veneno de *B. jararaca* (µg/mL) que produziu 70-80% de hemólise foi chamada de concentração mínima hemolítica indireta (CMHI), na qual foi a unidade arbitrária deste ensaio. Ressalta-se que esta unidade é amplamente usada na Toxinologia.

### **3.7.1. EFEITO DO EXTRATO OU DERIVADOS SINTÉTICOS NA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO VENENO DE *B. jararaca***

O efeito do extrato aquoso de *S. brasiliensis* ou dos 10 derivados 1,2,3-triazol foi avaliado incubando-os com 1 CMHI do veneno (3,9 µg/mL) por 30 min a 25 °C, na proporção de 1:5 ou 1:10 (veneno:extrato ou derivados, p/p). Em seguida, a atividade hemolítica realizada, como descrita acima. Como controle positivo, o veneno de *B. jararaca* foi incubado com salina; e os controles negativos continham somente o extrato, ou derivados ou solventes, sem adição de veneno. Ressalta-se que esta atividade hemolítica não foi realizada para o veneno de *B. jararacussu*, pois este veneno tem baixa atividade hemolítica e necessitaríamos de uma quantidade muito grande de veneno de *B. jararacussu*.

### **3.8. ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu***

A atividade hemorrágica do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi avaliada pelo método de Kondo *et al.*, (1960). 100 µL de diferentes concentrações de cada veneno foram injetados por via subcutânea (s.c.) na pele do abdômen dos camundongos. E, 2h após a injeção, os animais foram eutanasiados, a pele retirada, estirada e os locais de injeção analisados visualmente, e com auxílio de um paquímetro digital, o halo hemorrágico foi mensurado. A quantidade de veneno (µg/camundongo) capaz de produzir um halo hemorrágico de cerca de 10 milímetros (mm) foi designada de Dose Mínima Hemorrágica (DMH). Esta DMH é uma unidade arbitrária usada na Toxinologia. Neste ensaio de hemorragia não foi construída uma curva dose x resposta (utilizando-se 4 ou 5 doses de veneno) justamente para reduzir o número de animais utilizados. Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa deram um direcionamento para facilmente achar a DMH.

#### **3.8.1. EFEITO DO EXTRATO OU DERIVADOS SINTÉTICOS NA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu***

O efeito inibitório do extrato aquoso de *S. brasiliensis* ou dos 10 derivados 1,2,3-triazol foi avaliado por meio de três protocolos experimentais: (1), protocolo de incubação, na qual o extrato ou os 10 derivados foram incubados com 2 DMH do veneno de *B. jararaca* (22 µg/animal) e *B. jararacussu* (30 µg/animal) por 30 min a 25 °C, na proporção de 1:5 ou 1:10 (veneno:extrato ou derivados, p/p). Após, a mistura foi injetada s.c. e a hemorragia analisada como descrito; (2), no protocolo de tratamento, o veneno de *B. jararaca* (22 µg/animal) e *B. jararacussu* (30 µg/animal) foi injetado por via s.c. e 30 min depois, o extrato da planta foi administrado por via s.c. (e no mesmo local da injeção do veneno), ou por via oral ou i.v. (intravenosa). Após 2h da injeção do veneno, a atividade hemorrágica foi avaliada conforme descrito acima. Além disso, uma outra dinâmica foi empregada, na qual o veneno foi injetado por via s.c. e após 30min (1ª injeção) e 60min (2ª injeção), o extrato de planta foi injetado s.c. nos animais. Após 6h da injeção do veneno, os animais foram eutanasiados e a atividade

hemorrágica avaliada. O extrato da planta não foi ensaiado neste protocolo de prevenção.

Nos ensaios com os 10 derivados sintéticos, no protocolo de tratamento, o veneno de *B. jararaca* (22 µg/animal) foi injetado por via s.c., e após 10min, somente os derivados AM006 ou AM010 ou solventes (DMSO ou salina - controle positivo) foram administrados por via s.c. e no mesmo local da injeção de veneno. Após 2h da injeção do veneno, a atividade hemorrágica foi avaliada. No protocolo de prevenção, os derivados AM006 ou AM010 ou solventes (salina ou DMSO – controle positivo) foram administrados por via s.c. e, após 10min, 2 DMH do veneno de *B. jararaca* (22 µg/animal) foram injetadas por via s.c. Duas horas após a administração dos derivados ou solventes, os animais foram eutanasiados e a atividade hemorrágica analisada.

Para qualquer protocolo experimental, a atividade hemorrágica foi expressa pela média em mm do halo hemorrágico induzido pelo veneno na presença ou ausência do extrato ou derivados. Para os controles negativos, os animais receberam a injeção dos solventes ou extratos ou derivados isoladamente, na ausência do veneno. O volume total de injeção foi de 100 µL.

### **3.9 ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu***

A indução na formação do edema causada pelos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi determinada de acordo com Vishwanath *et al.*, (1987). Os camundongos receberam injeção de 50 µL dos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* por via s.c. na região subplantar da pata direita, enquanto a pata esquerda recebeu 50 µL de solventes (salina ou DMSO - controle negativo). Uma hora após a injeção do veneno, os animais foram eutanasiados e suas patas cortadas na junção do tornozelo, pesadas e o edema foi avaliado e expresso como aumento no peso da pata direita em relação à esquerda. Neste ensaio não foi construída uma curva dose x resposta (utilizando-se 4 ou 5 doses de veneno) justamente para reduzir o número de animais utilizados. Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa deram um direcionamento para facilmente achar a dose de veneno a ser utilizada.

### **3.9.1. EFEITO DO EXTRATO OU DERIVADOS SINTÉTICOS NA ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu***

O efeito da planta foi avaliado através do protocolo de incubação (1), na qual o extrato da planta foi incubado com veneno das serpentes por 30min a 25 °C ou através do protocolo de tratamento (2), na qual o veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi injetado por via s.c. na pata dos camundongos e 30min depois, o extrato da planta foi injetado por via s.c., por via oral ou i.v. Ao final das injeções, o edema foi avaliado como descrito anteriormente. Em paralelo, os animais que receberam a injeção somente da planta ou salina na ausência do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foram considerados como, controle negativo.

O efeito dos dez derivados sintéticos no edema causado pelo veneno de *B. jararaca* foi investigado somente através do protocolo de incubação (1), seguindo a descrição mencionada no item 3.9. O controle negativo consistiu da injeção somente dos 10 derivados ou DMSO, na ausência do veneno de *B. jararaca*.

### **3.10. ATIVIDADE LETAL DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu***

Os camundongos receberam por via intraperitoneal (i.p.) o veneno de *B. jararaca* (58 µg/camundongo) e *B. jararacussu* (75 µg/camundongo) ou solventes (salina ou DMSO), e o tempo de sobrevivência dos camundongos foi observado por um período máximo de 6 h. Após esse tempo, os animais foram eutanasiados. O volume máximo de injeção para esta atividade foi de 100 µL.

#### **3.10.1. EFEITO DO EXTRATO OU DERIVADOS SINTÉTICOS NA ATIVIDADE LETAL DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu***

O efeito do extrato da planta foi realizado através de dois protocolos: (1) incubação, na qual o extrato da planta foi incubado o com veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* por 30min a 25 °C, e, em seguida, a mistura foi injetada por via i.p. nos camundongos; (2) tratamento, o veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi injetado por via i.p., e 30min depois, o extrato da planta foi administrado por via i.p., oral ou i.v.

Ao final das injeções, o tempo de sobrevivência foi monitorado. O grupo controle negativo recebeu somente a injeção do extrato da planta ou salina.

O efeito dos 10 derivados sintéticos foi somente investigado no protocolo de incubação (1). Os dez derivados foram incubados somente com o veneno de *B. jararaca*, seguido do protocolo da atividade letal. O grupo controle negativo recebeu a injeção somente dos dez derivados ou DMSO.

### **3.11. TOXICIDADE DO EXTRATO DA PLANTA OU DERIVADOS SINTÉTICOS**

#### **3.11.1. Através do teste *in vitro* de hemotoxicidade**

A toxicidade *in vitro* do extrato aquoso da planta *S. brasiliensis* foi realizada através do teste de hemotoxicidade, de acordo com Bauer *et al.*, (2012). O extrato da planta (2 mg/mL) ou salina (controle negativo) foi incubado com uma suspensão a 13% (v/v) de hemácias lavadas por 3 hr a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1.800 x *g* por 5 mins e o grau de hemólise foi avaliada através da liberação de hemoglobina e quantificada em A 578 nm. 100 e 0% de hemólise foram obtidos através da adição de água destilada e salina à suspensão de hemácias, respectivamente.

#### **3.11.2. Através do teste *in vivo* de dose aguda**

A toxicidade *in vivo* do extrato aquoso da planta *S. brasiliensis* ou dos dez derivados foi realizada através do teste de dose aguda, na qual camundongos (grupo de seis) receberam injeção i.p. de uma dose única (100 µL) do extrato da planta (1 mg/animal) ou derivados (700 µg/animal). Como controle negativo, salina ou DMSO (0,9 % v/v, concentração final) foi injetado i.p. nos animais. Após a injeção, os animais foram observados durante 48 h, e em seguida foram eutanasiados.

### **3.11.3. Através de teste *in silico***

AdmetSAR versão 2.0 (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>) foi usado para prever *in silico* as propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) dos dez derivados 1,2,3-triazol (YANG *et al.*, 2018; CHENG *et al.*, 2012).

### **3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), obtidos com o número indicado de animais ou experimentos realizados. A análise estatística foi realizada pela análise da Variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os gráficos e a análise estatística foram realizados utilizando o software Graphpad Prism 8.0 (Software Inc., San Diego, CA, EUA).

# 4. RESULTADOS

# CAPÍTULO I

## (PLANTA)

Este capítulo descreve o efeito do extrato aquoso da planta *S. brasiliensis* em inibir as atividades tóxicas *in vitro* (coagulante, proteolítica e hemolítica) e *in vivo* (hemorrágica, edema e letal) causadas pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* no protocolo de incubação. Entretanto, para as atividades *in vivo*, o efeito da planta *S. brasiliensis* foi analisado através do protocolo designado tratamento. E, nesta abordagem experimental, a eficácia de neutralização da planta foi investigada através de diferentes vias de administração (subcutânea, intraperitoneal, intradérmica, oral/gavagem ou intravenosa) do extrato aquoso de *S. brasiliensis*.

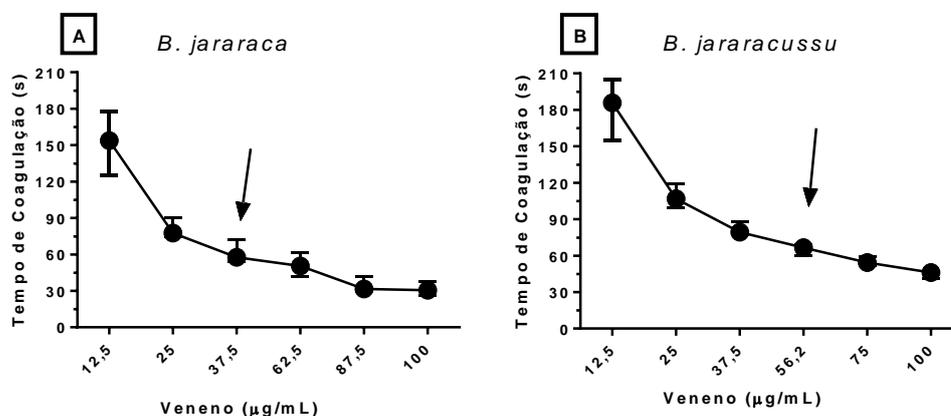
Os resultados foram publicados no periódico "Biomedicine and Pharmacotherapy". 2020:125:109951. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109951

#### 4.1. TOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE *S. brasiliensis*

A toxicidade do extrato aquoso da planta *S. brasiliensis* foi avaliada por ensaio *in vitro* (hemotoxicidade) e *in vivo* (dose aguda). Em nenhum destes ensaios, o extrato da planta foi tóxico (dados não mostrados), mesmo em concentração de 2.000  $\mu\text{g/mL}$  e na dose de 800  $\mu\text{g/animal}$ , que representam valores muito acima daqueles usados nas atividades *in vitro* (coagulante, hemolítica ou proteolítica) e *in vivo* (hemorragia, edema e letal). A maior concentração usada da planta nos experimentos *in vitro* foi de 370  $\mu\text{g/mL}$ ; enquanto nos experimentos *in vivo* foi de 750  $\mu\text{g/animal}$ .

#### 4.2. ATIVIDADE COAGULANTE DO VENENO DE *B. jararaca* ou *B. jararacussu*

O veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* (12,5  $\mu\text{g/mL}$  – 100  $\mu\text{g/mL}$ ) foi capaz de coagular o plasma de maneira concentração-dependente. Uma concentração mínima coagulante (CMC) foi determinada como a concentração de veneno ( $\mu\text{g/mL}$ ) capaz de coagular o plasma em 60 segundos, que foi aproximadamente de 37  $\mu\text{g/mL}$  para o veneno de *B. jararaca*, e 56  $\mu\text{g/mL}$  para o veneno de *B. jararacussu* (Figura 15). A CMC de cada veneno está evidenciada com uma seta em ambos os gráficos (Figura 15).

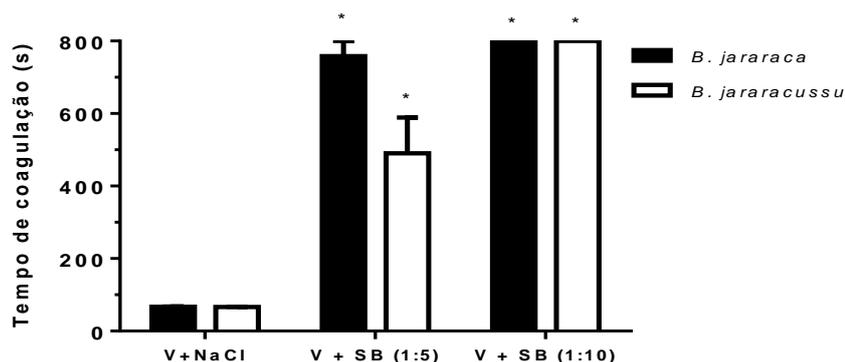


**Figura 15:** Atividade coagulante sobre o plasma do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

Diferentes concentrações (12,5 – 100  $\mu\text{g/mL}$ ) do veneno de *B. jararaca* (A) e *B. jararacussu* (B) foram adicionados ao plasma e o tempo de coagulação monitorado, como descrito em métodos. A concentração mínima coagulante (CMC) de cada veneno está indicada no gráfico com uma seta, que foi de 37  $\mu\text{g/mL}$  para *B. jararaca*, e, 56  $\mu\text{g/mL}$  para *B. jararacussu*.

#### 4.2.1. EFEITO DA PLANTA *S. brasiliensis* NA ATIVIDADE COAGULANTE DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu*

Em seguida, o efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* foi avaliado na atividade coagulante do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*. Para tanto, 1 (uma) CMC do veneno de *B. jararaca* (37 µg/mL) e *B. jararacussu* (56 µg/mL) foi incubado com o extrato de *S. brasiliensis* na proporção 1:5 ou 1:10 (veneno:extrato, p/p) ou com salina (controle positivo) por 30min a 25 °C, e em seguida, a atividade coagulante foi realizada. Como observado na figura 16, o extrato da planta *S. brasiliensis* nas proporções de 1:5 ou 1:10 foi capaz de inibir a atividade coagulante de ambos os venenos. Na proporção 1:5, o extrato da planta prolongou a coagulação causada pelo veneno de *B. jararaca* em até 12 vezes (de 66 para 758 segundos), quando comparado com o controle positivo (veneno + salina, 66 segundos). Para o veneno de *B. jararacussu*, o extrato da planta, na proporção 1:5 foi capaz de prolongar o tempo de coagulação em cerca de 8 vezes (de 66 para 490 segundos) (Figura 16). Entretanto, na proporção 1:10, o extrato da planta foi capaz de impedir a coagulação causada pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* durante o tempo máximo de observação, que foi de 800 segundos (Figura 16). O extrato da planta na ausência do veneno não promoveu a coagulação do plasma, e dessa forma, não possui um efeito pro-coagulante (dados não mostrados).

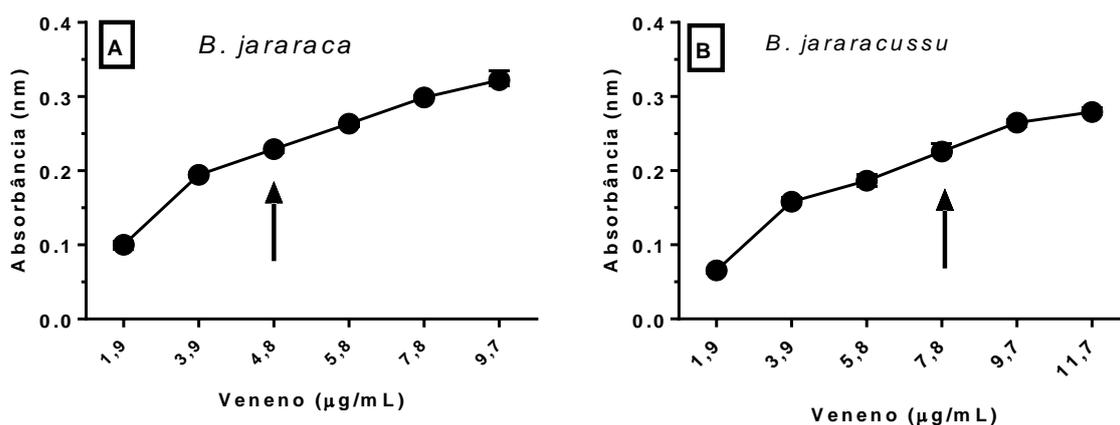


**Figura 16:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* na coagulação induzida por *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

O veneno de *B. jararaca* (colunas pretas, 37 µg/mL) e *B. jararacussu* (colunas brancas, 56 µg/mL) foi incubado com 150 mM NaCl ou com o extrato da planta *S. brasiliensis* (SB) na proporção de 1:5 ou 1:10 por 30min a 25 °C. Em seguida, o tempo de coagulação foi monitorado, como descrito no método. Os resultados expressam a média ± SEM de três experimentos individuais (n=6). \*, p<0,05 quando comparado ao controle (Veneno + NaCl). V = Veneno.

### 4.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu*

O veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi capaz de hidrolisar de maneira concentração dependente (1,9  $\mu\text{g/mL}$  – 11,7  $\mu\text{g/mL}$ ) o substrato proteico, azocaseína. Esse resultado demonstra que ambos os venenos possuem uma atividade proteolítica, e que dessa forma, contém no veneno enzimas do tipo proteases. A concentração de veneno que causou uma variação de absorbância (A) de cerca de 0,2 em comprimento de onda de 420 nm foi designada de concentração efetiva (CE), e que representa cerca de 70 a 80 % da atividade máxima do veneno. A CE do veneno de *B. jararaca* foi de 4,8  $\mu\text{g/mL}$  e, para o veneno de *B. jararacussu* foi de 7,8  $\mu\text{g/mL}$ . A CE de ambos os venenos está marcada no gráfico com uma seta (Figura 17). Esta CE foi considerada como 100 % de atividade proteolítica.

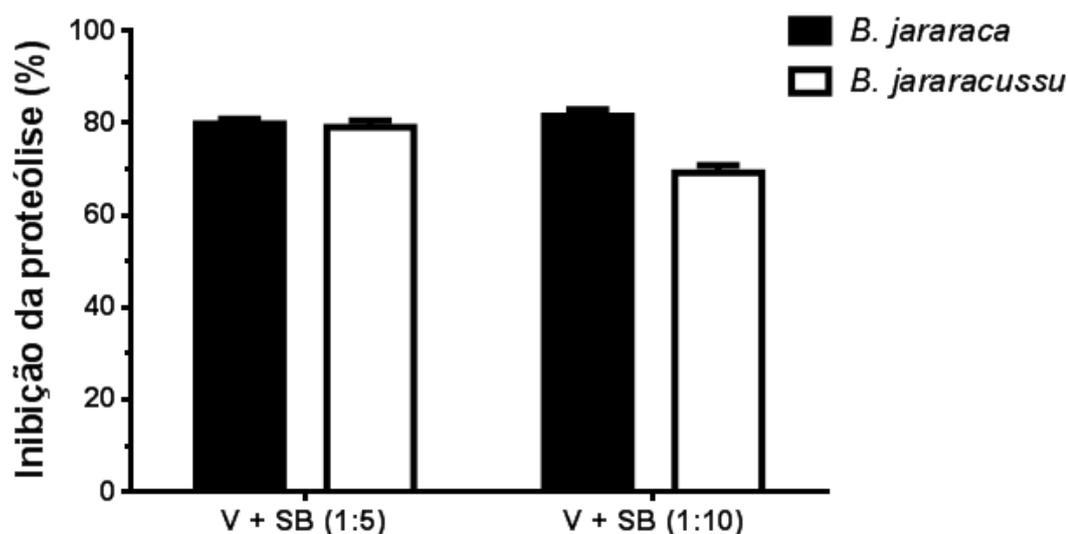


**Figura 17:** Atividade proteolítica do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

Diferentes concentrações (1,9 – 11,7  $\mu\text{g/mL}$ ) de veneno de *B. jararaca* (A) e *B. jararacussu* (B) foram capazes de causar uma variação de absorbância (A) em comprimento de onda de 420 nm. A concentração efetiva (CE) de cada veneno está indicada no gráfico com uma seta, que foi de 4,8  $\mu\text{g/mL}$  para *B. jararaca*, e, 7,8  $\mu\text{g/mL}$  para *B. jararacussu*.

#### 4.3.1. EFEITO DA PLANTA *S. brasiliensis* NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu*

Em seguida, 1 (uma) CE do veneno de *B. jararaca* (4,8 µg/mL) e *B. jararacussu* (7,8 µg/mL) foi incubado com o extrato da planta *S. brasiliensis* na proporção de 1:5 ou 1:10 (veneno:extrato, p/p) ou com salina (controle positivo, não mostrado) por 30min a 25 °C. Como mostrado na figura 18, nas proporções 1:5 ou 1:10, o percentual de inibição da atividade proteolítica foi cerca de 80 % para o veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*. Apesar do extrato da planta *S. brasiliensis* na proporção 1:10 ter inibido 70 % a atividade proteolítica do veneno de *B. jararacussu*, não há diferença considerável (Figura 18). O extrato da planta na ausência do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* não foi capaz de hidrolisar a azocaseína e, portanto, não tem atividade proteolítica (dados não mostrados).



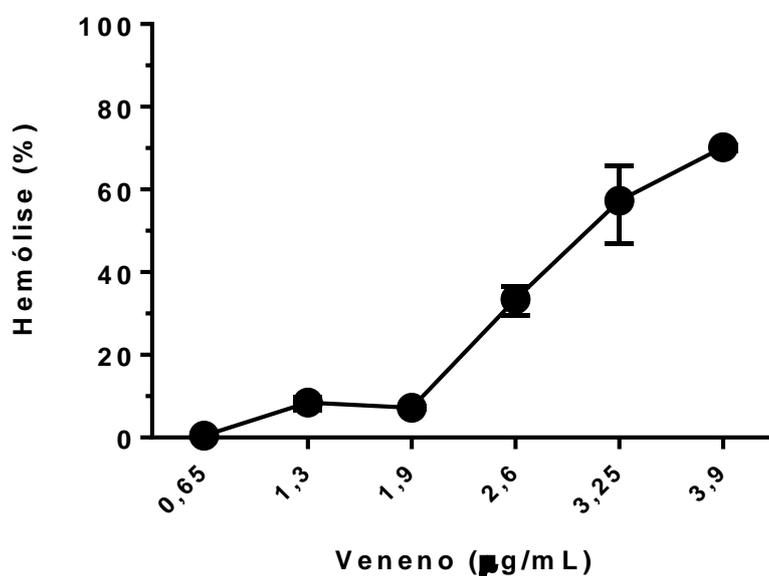
**Figura 18:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* na proteólise induzida por *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

O extrato da planta *S. brasiliensis* (SB) foi incubado com o veneno (V) de *B. jararaca* (4,8 µg/mL) e *B. jararacussu* (7,8 µg/mL) na proporção de 1:5 e 1:10 (veneno:planta, p/p) por 30min a 25 °C, e, em seguida, a atividade proteolítica foi realizada como descrito no método. Os resultados expressam a média ± SEM de três experimentos individuais (n=6).

#### 4.4. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO VENENO DE *B. jararaca*

O veneno de *B. jararaca* (0,65  $\mu\text{g/mL}$  – 3,9  $\mu\text{g/mL}$ ) foi capaz de provocar hemólise em eritrócitos humanos de maneira concentração-dependente (Figura 19). A concentração de veneno ( $\mu\text{g/mL}$ ) que causou 70 – 80% de lise na suspensão de hemácias foi chamada de concentração mínima hemolítica indireta (CMHI), que foi de aproximadamente 3,9  $\mu\text{g/mL}$ . Esta CMHI foi usada nos experimentos de inibição, que será mostrada no próximo tópico (4.4.1).

A atividade hemolítica não foi avaliada para o veneno de *B. jararacussu*, pois este veneno possui uma baixa atividade hemolítica, e necessitaria de uma grande quantidade veneno de *B. jararacussu* para a realização deste ensaio.

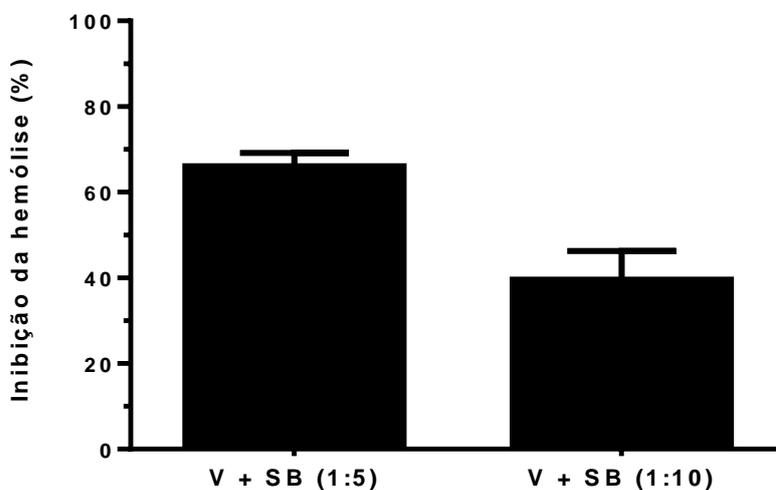


**Figura 19:** Atividade hemolítica do veneno de *B. jararaca*.

Diferentes concentrações (0,65  $\mu\text{g/mL}$  – 3,9  $\mu\text{g/mL}$ ) do veneno de *B. jararaca* foram adicionadas ao meio reacional e a hemólise (%) mensurada como descrito em métodos.

#### 4.4.1. EFEITO DA PLANTA *S. brasiliensis* NA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO VENENO DE *B. jararaca*

O extrato da planta *S. brasiliensis* nas proporções de 1:5 ou 1:10 (veneno:extrato, p/p) ou salina (controle positivo) foi incubado com 1 (uma) CMHI do veneno de *B. jararaca* (3,9 µg/mL) por 30min a 25 °C, e, em seguida, a atividade hemolítica foi realizada. O extrato da planta foi eficaz em inibir a hemólise causada pelo veneno de *B. jararaca* em aproximadamente 70 e 40 % nas proporções 1:5 ou 1:10, respectivamente (Figura 20).

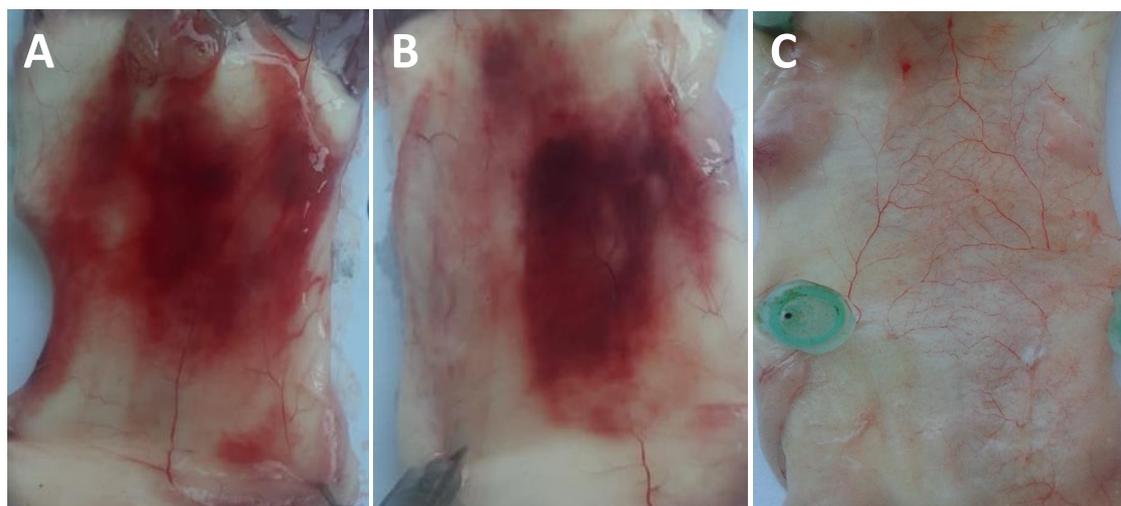


**Figura 20:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* na hemólise causada pelo veneno de *B. jararaca*.

O extrato da planta *S. brasiliensis* (SB) foi incubado com veneno (V) de *B. jararaca* (3,9 µg/mL) na proporção de 1:5 e 1:10 (p/p) por 30min a 25 °C, e em seguida atividade hemolítica realizada. Os resultados estão mostrados como % inibição da hemólise e expressam a média ± SEM de três experimentos individuais (n=6).

#### 4.5. ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu*

A injeção subcutânea (s.c.) do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* no abdômen de camundongos causou uma hemorragia na pele dos animais (Figura 21). A dose de veneno ( $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) capaz de formar um halo hemorrágico de aproximadamente 10 milímetros (mm) foi designada como dose mínima hemorrágica (DMH), que foi de 11  $\mu\text{g}/\text{animal}$  para o veneno de *B. jararaca* e 15  $\mu\text{g}/\text{animal}$  para *B. jararacussu*. A curva dose-resposta não foi realizada neste ensaio com intuito de reduzir o número de animais neste experimento em observância ao princípio dos 3Rs no uso de animais de experimentação (redução, refinamento e substituição), principalmente no item: redução. A dose de veneno utilizada está em acordo com resultados prévios do LAVENOTOXI para esta atividade. A figura 21 mostra uma foto ilustrativa da hemorragia causada pela injeção s.c (subcutânea) do veneno de *B. jararaca* (Figura 21, painel A) e *B. jararacussu* (Figura 21, painel B). A injeção de salina na ausência do veneno não provocou hemorragia nos animais (Figura 21, painel C).

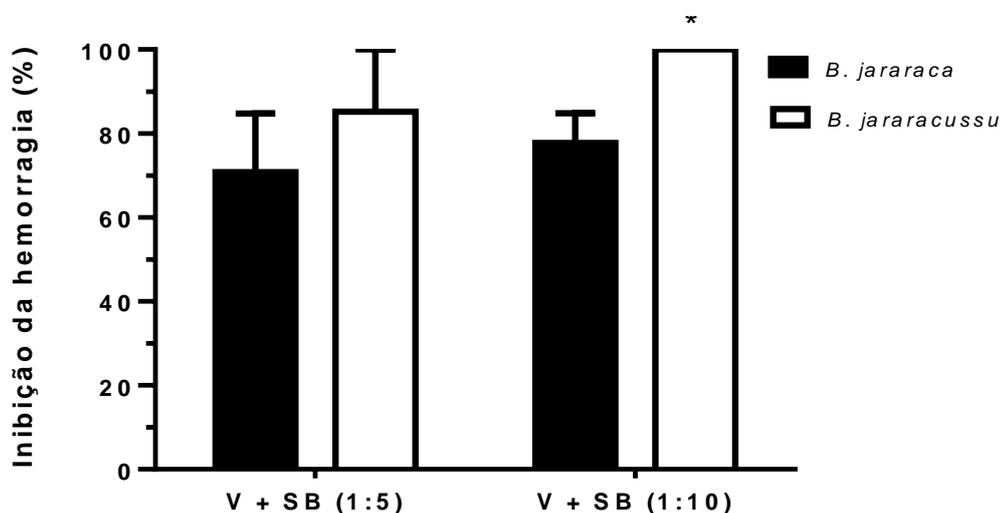


**Figura 21:** Fotos ilustrativas da hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* ou *B. jararacussu*.

**A=** veneno de *B. jararaca* (22  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ); **B=** veneno de *B. jararacussu* (30  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ); **C=** salina

#### 4.5.1. EFEITO DA PLANTA *S. brasiliensis* NA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu* NO PROTOCOLO DE INCUBAÇÃO

Em seguida, 2 (duas) DMH do veneno de *B. jararaca* (22 µg/animal) e *B. jararacussu* (30 µg/animal) foram incubadas com salina (controle positivo) ou com o extrato da planta *S. brasiliensis* na proporção de 1:5 ou 1:10 (veneno:planta, p/p) por 30min a 25 °C, e uma alíquota de 100 µL desta mistura foi injetada s.c. nos animais e o halo hemorrágico mensurado. Como observado na figura 22, o extrato da planta *S. brasiliensis* na proporção de 1:5 inibiu cerca de 70 e 85 % a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, respectivamente. Entretanto, não há diferença significativa para ambos os venenos nesta proporção. Na proporção de 1:10, o extrato inibiu 77 % a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca*, mas que também não difere consideravelmente do percentual de inibição na proporção 1:5. Contudo, na proporção 1:10, o extrato da planta *S. brasiliensis* inibiu 100 % a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararacussu* (Figura 22). A injeção do extrato da planta *S. brasiliensis* (300 µg/mL) na ausência do veneno de *B. jararaca* ou *B. jararacussu* não induziu hemorragia nos animais (dados não mostrados).



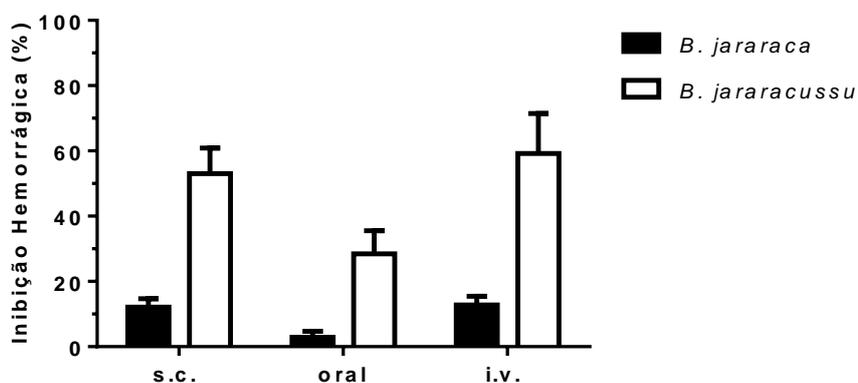
**Figura 22:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* na hemorragia induzida por *B. jararaca* e *B. jararacussu* no protocolo de incubação.

O extrato da planta *S. brasiliensis* (SB) foi incubado com veneno (V) de *B. jararaca* (22 µg/animal) e *B. jararacussu* (30 µg/animal) na proporção de 1:5 ou 1:10 por 30min a 25°C. Em seguida, uma alíquota da mistura foi injetada s.c. nos animais e a atividade hemorrágica avaliada e o percentual de inibição da hemorragia foi obtido e mostrado no gráfico. Os resultados expressam a média ± SEM de três experimentos individuais (n=6).

#### 4.5.2. EFEITO DA PLANTA *S. brasiliensis* NA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu* NO PROTOCOLO DE TRATAMENTO

O veneno de *B. jararaca* (22 µg/animal) e *B. jararacussu* (30 µg/animal) foi injetado por via s.c. no abdômen dos camundongos, e após 30min, salina (controle positivo) ou o extrato da planta *S. brasiliensis* (300 µg/animal) foi administrado por via s.c., oral ou i.v.. Em seguida, a atividade hemorrágica foi avaliada, como descrito em método. Como podemos observar na figura 23, quando administrado por via s.c. ou i.v., o extrato da planta reduziu a hemorragia provocada pelo veneno de *B. jararacussu* em torno de 60 %. Enquanto que, na administração do extrato da planta por via oral, a inibição da hemorragia causada pelo veneno de *B. jararacussu* foi de 30 %.

Por outro lado, o extrato da planta neste protocolo e nestas vias de administração foi capaz de inibir menos a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca*. Na administração oral da planta, a inibição foi de 2 % e 12 % para as vias de administração s.c. ou i.v. (Figura 23). Dessa forma, podemos considerar que a administração do extrato da planta 30min após a injeção dos venenos (protocolo tratamento) reduziu a atividade hemorrágica causada pelo veneno de *B. jararacussu* de forma mais eficaz do que a hemorragia induzida pelo veneno de *B. jararaca*.

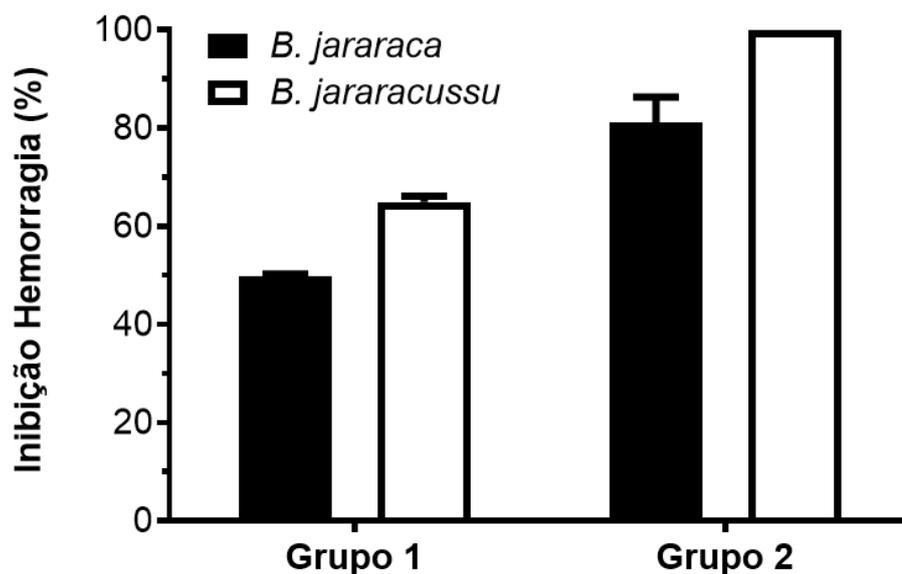


**Figura 23:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* na hemorragia induzida pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* no protocolo de tratamento.

O veneno de *B. jararaca* (22 µg/animal) e *B. jararacussu* (30 µg/animal) foi administrado por via s.c. no abdômen dos camundongos, e, 30min depois, o extrato da planta *S. brasiliensis*, na proporção 1:10 (veneno:planta, p/p) foi administrado por via subcutânea (s.c.), oral ou intravenosa (i.v.). Em seguida, a atividade hemorrágica foi avaliada e o percentual de inibição mensurado. Os resultados expressam a média ± SEM de dois experimentos individuais (n=6).

O extrato da planta *S. brasiliensis* foi capaz de inibir a atividade hemorrágica causada pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* nos protocolos experimentais, incubação e tratamento (Figuras 22 e 23). E, em todos esses protocolos, apenas uma única injeção da planta nos animais foi feita. Portanto, em outra abordagem experimental, o efeito de *S. brasiliensis* em inibir a atividade hemorrágica do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi investigado através de duas injeções sucessivas da planta, e comparado com o efeito da planta quando apenas uma única injeção foi realizada (Figura 24). No primeiro grupo (grupo 1), o veneno de *B. jararaca* (22 µg/mL) e *B. jararacussu* (30 µg/mL) foi injetado por via s.c., e depois de 30min, a planta de *S. brasiliensis* (220 µg/mL e 300 µg/mL, que representa uma relação de 1:10 veneno:planta) foi injetada por via s.c. nos camundongos no mesmo local de injeção do veneno (Figura 24). No segundo grupo (grupo 2), os animais receberam injeção s.c. do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, e 30min depois, a primeira injeção da planta foi realizada e 30min depois, a segunda injeção da planta. E, dessa forma, então, duas injeções da planta foram realizadas e com 30min de intervalo entre uma e outra. De acordo com a figura 24, no grupo que recebeu apenas uma injeção da planta (grupo 1), o extrato da planta inibiu a hemorragia em 49 % para o veneno de *B. jararaca* e 64 % para *B. jararacussu*. E, no grupo 2, o extrato da planta inibiu 85 e 100 % a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, respectivamente (Figura 24). Vale ressaltar que este protocolo foi diferente daquele denominado protocolo de incubação em um ponto, que foi o período total do experimento. Neste experimento, o tempo total foi de 6h, ou seja, após 6h da injeção do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, os animais foram sacrificados. E, no protocolo de incubação (ver figura 22), o período total do experimento foi de 2h, ou seja, os animais foram sacrificados após 2h da injeção do veneno.

Portanto, no grupo 2, os resultados foram mais promissores, ou seja, a planta inibiu totalmente a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararacussu* (Figura 24). Analisando a dinâmica empregada neste protocolo, podemos ter em vista a importância de um reforço da injeção da planta, pois os resultados foram mais satisfatórios quando realizada duas injeções da planta *S. brasiliensis*.

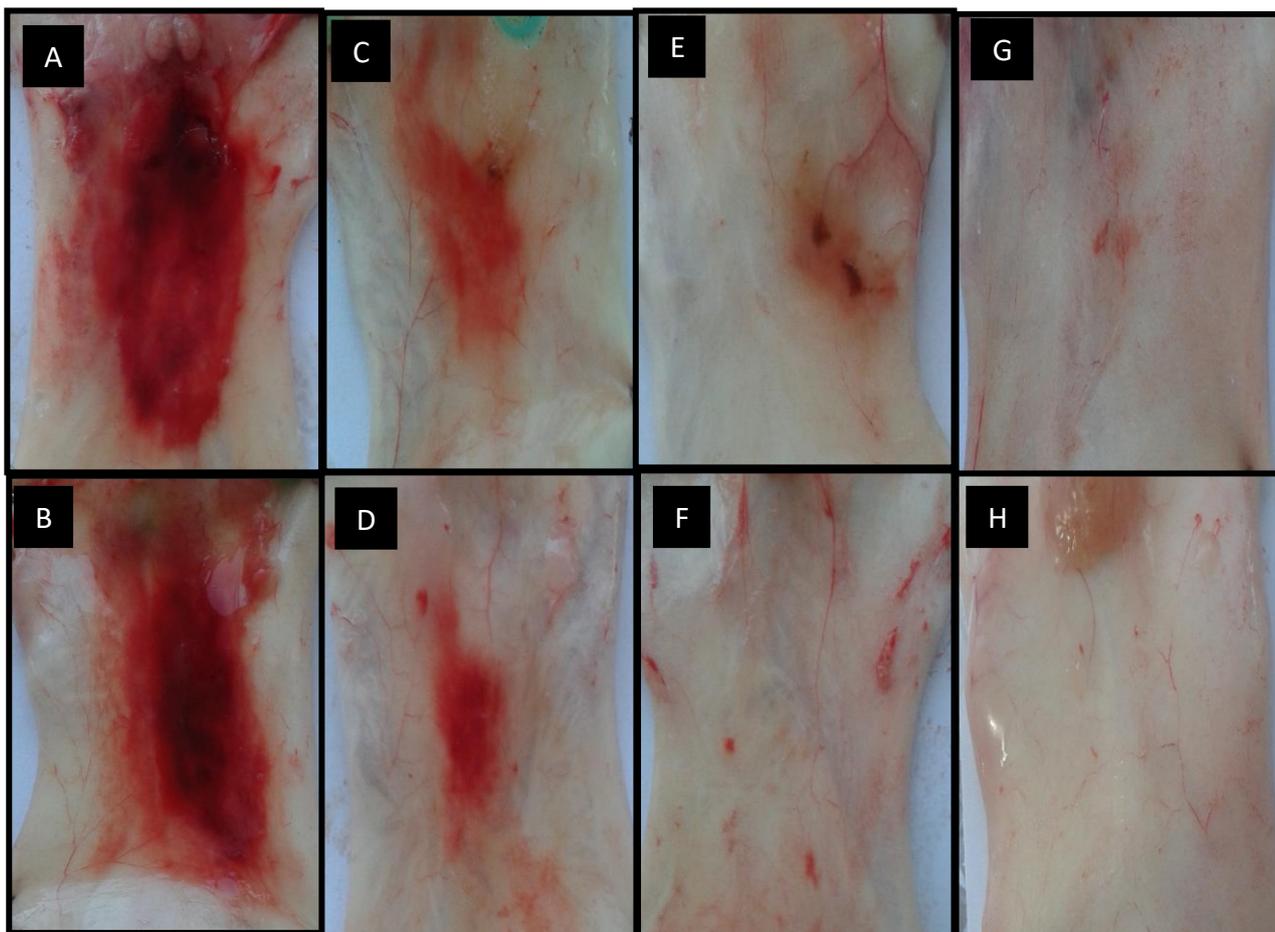


**Figura 24:** Efeito do extrato de *S. brasiliensis* na hemorragia causada pelos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

O veneno de *B. jararaca* (22  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) e *B. jararacussu* (30  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) foi injetado por via subcutânea (s.c.) nos camundongos e 30min depois, o extrato da planta *S. brasiliensis* (220  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *B. jararaca* e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *B. jararacussu*) foi administrado s.c. no mesmo local da injeção do veneno (Grupo 1). No grupo 2, uma segunda injeção do extrato da planta foi realizada 30min após a primeira administração da planta. E, após 6h da injeção do veneno, os animais foram sacrificados e a atividade hemorrágica realizada como descrita em métodos. Os resultados expressam a média  $\pm$  SEM de dois experimentos individuais (n=6).

A figura 25 apresenta fotografias do halo hemorrágico causado pela injeção s.c. do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* e o efeito da planta *S. brasiliensis* nesta atividade hemorrágica. Estas fotos são complementares aos resultados mostrados na figura 21. Ressaltando que o tempo total do experimento do protocolo da figura 23 foi de 6h. Como mostrado na figura 21, a injeção do veneno de *B. jararaca* (A) e *B. jararacussu* (B) produziu uma intensa hemorragia no local da injeção. A hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi reduzida pela injeção única da planta (grupo 1), após 30min da injeção do veneno de *B. jararaca* (C) e *B. jararacussu* (D), e que esta inibição foi mais eficaz na hemorragia causada pelo veneno de *B. jararacussu*. O mesmo fenômeno foi visto para a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, na qual não se observou formação do halo hemorrágico (Figura 25, grupo 2, painéis E ou F). Nesta foto, observam-se somente dois furos na pele dos camundongos referentes à injeção da planta. De fato, o extrato aquoso de *S. brasiliensis* foi capaz de reduzir a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* (Figura 25).

Este resultado é extremamente motivador, pois a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararacussu* e *B. jararaca*, que são serpentes de interesse clínico no Brasil foi totalmente inibida através da injeção repetida (duas injeções) da planta e com intervalo de 30min. Entretanto, com apenas uma única injeção da planta a inibição foi de 50 e 64 %, respectivamente. Como observado nas fotos, os animais controles de envenenamento (controle positivo), receberam injeção s.c. do veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, e 30min depois, a injeção de salina (Figura 25). E, dessa forma, então, houve uma intensa hemorragia no local da injeção. Por outro lado, a injeção da planta ou salina na ausência do veneno não provocou hemorragia nos animais (Figura 25, painéis G ou H).

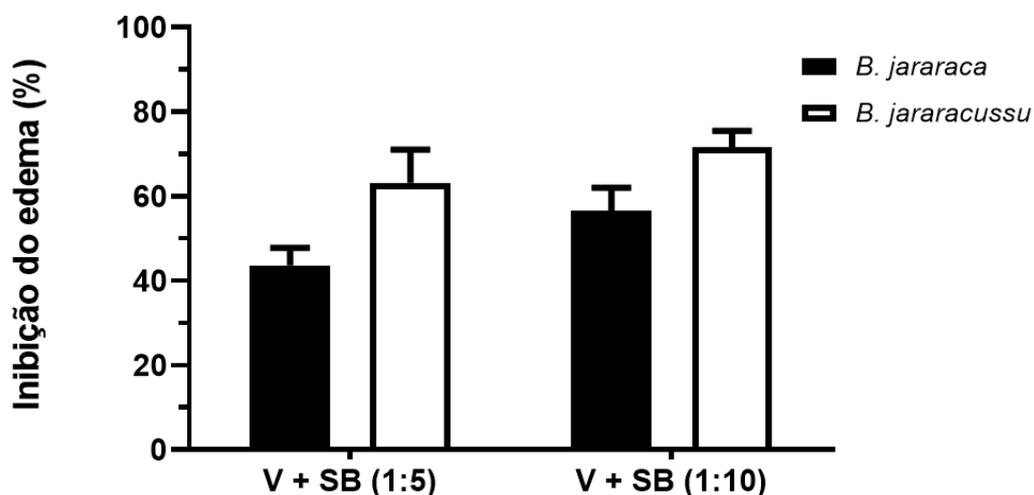


**Figura 25:** Efeito do extrato aquoso da planta *S. brasiliensis* na hemorragia induzida pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* no protocolo de tratamento.

Grupo positivo 6h: O veneno de *B. jararaca* (A) e *B. jararacussu* (B) foi injetado por via s.c. e 6h depois, os camundongos foram eutanasiados. Grupo com 1 injeção: O veneno de *B. jararaca* (C) e *B. jararacussu* (D) foi injetado por via s.c., e o extrato aquoso de *S. brasiliensis* foi administrada por via s.c. (no mesmo local do veneno) 30min mais tarde. Após 6h da injeção do veneno, os camundongos foram sacrificados. Grupo com 2 injeções: O veneno de *B. jararaca* (E) e *B. jararacussu* (F) foi injetado por via s.c. e, em seguida, duas injeções do extrato foram realizadas por via s.c. (no mesmo local do veneno) com intervalo de 30min entre cada uma das injeções. Após 6h da injeção do veneno, os camundongos foram eutanasiados. Controle negativo: O extrato aquoso de *S. brasiliensis* (G) ou salina (H), na ausência do veneno, foi administrado por via s.c. Após 6h, os camundongos foram eutanasiados.

#### 4.6. EFEITO DA PLANTA *S. brasiliensis* NA ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu* NO PROTOCOLO DE INCUBAÇÃO

O veneno de *B. jararaca* (11 µg/animal) e *B. jararacussu* (15 µg/animal) foi incubado com salina (controle positivo) ou com o extrato da planta *S. brasiliensis* na proporção 1:5 ou 1:10 (veneno:planta, p/p) por 30min a 25 °C. Em seguida, 50 µL de cada mistura foram injetados i.d. na pata esquerda e direita dos camundongos, respectivamente, e a atividade edematogênica foi avaliada. Como observado na figura 26, o extrato da planta *S. brasiliensis* na proporção de 1:5 (veneno:extrato, p/p) foi capaz de inibir cerca de 45 e 65 % o edema causado pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, respectivamente. Na proporção de 1:10 (veneno:extrato, p/p), o extrato de *S. brasiliensis* inibiu em cerca de 55 e 70 % a formação do edema, respectivamente (Figura 26). Além disso, o percentual de inibição do extrato da planta sobre o veneno de *B. jararacussu* não apresentou diferença considerável nas duas proporções, 1:5 ou 1:10 (Figura 26). A injeção i.d. isoladamente do extrato da planta *S. brasiliensis* (200 µg/mL) na pata dos camundongos não provocou edema nos animais (dados não mostrados). Sendo assim, o extrato da planta não apresentou atividade edematogênica.

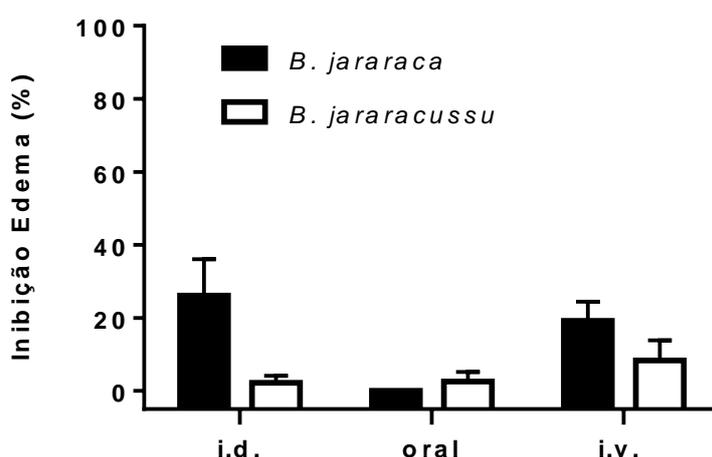


**Figura 26:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* no edema induzido por *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

O extrato da planta *S. brasiliensis* (SB) foi incubado com veneno de *B. jararaca* (11 µg/animal) e *B. jararacussu* (15 µg/animal) na proporção de 1:5 e 1:10 (veneno:planta, p/p), por 30min a 25 °C. Em seguida, a atividade edematogênica foi avaliada, e resultado mostrado como % inibição do edema. Os resultados expressam a média ± SEM de três experimentos individuais (n=6).

#### 4.6.1. EFEITO DA PLANTA *S. brasiliensis* NA ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu* NO PROTOCOLO DE TRATAMENTO

O veneno de *B. jararaca* (11 µg/animal) e *B. jararacussu* (15 µg/animal) foi injetado i.d. na região subplantar da pata direita dos camundongos, e 30min mais tarde, o extrato da planta *S. brasiliensis* foi administrado nos mesmos animais por diferentes vias: i.d., oral ou i.v. E, em seguida, a atividade edematogênica foi avaliada, como descrito em métodos. Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 27. O extrato da planta quando administrado por via i.d. ou i.v. obteve os maiores percentuais de inibição desta atividade, principalmente para o veneno de *B. jararaca*, sendo em torno de 26 e 20 %, respectivamente. Em contrapartida, a administração do extrato da planta administrado por via oral não reduziu o edema causado pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* (Figura 27). Para o edema causado pelo veneno de *B. jararacussu*, o extrato da planta administrada por via i.v. inibiu a formação do edema em a 8 %. Dessa forma, parece que o percentual de inibição da planta no edema causado pelo veneno de *B. jararaca* é similar e em torno de 20 % nas vias de administração i.d. e i.v. Portanto, a administração do extrato da planta *S. brasiliensis* pela via i.d. ou i.v. inibiu de forma mais eficaz o edema causado pelo veneno de *B. jararaca* do que aquele causado pelo veneno de *B. jararacussu* (Figura 27).



**Figura 27:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* na atividade edematogênica induzida pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* no protocolo de tratamento.

O veneno de *B. jararaca* (11 µg/animal) e *B. jararacussu* (15 µg/animal) foi administrado na pata dos camundongos, e 30min depois, o extrato da planta foi administrado por via intradérmica (i.d.), oral ou intravenosa (i.v.), na proporção veneno:planta de 1:10 (p/p). Em seguida, a atividade edematogênica foi avaliada, como descrito em métodos. Os resultados expressam o percentual de inibição da média ± SEM (n = 9).

#### 4.7. EFEITO DA PLANTA *S. brasiliensis* NA ATIVIDADE LETAL DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu* NO PROTOCOLO DE INCUBAÇÃO

A injeção i.p. do veneno de *B. jararaca* (58 µg/animal) e *B. jararacussu* (75 µg/animal) incubado com salina (controle positivo) levou os animais a óbito em cerca de 70min (Tabela 1). Quando esta dose de veneno de *B. jararaca* foi incubada com o extrato de *S. brasiliensis* nas proporções 1:5 ou 1:10 (veneno:planta, p/p), observou-se que o extrato da planta impediu que os animais fossem a óbito durante o tempo máximo de observação do experimento, que foi de 300min (Tabela 1). Após este tempo de observação, os animais foram eutanasiados.

Para o veneno de *B. jararacussu*, na proporção de 1:5 (veneno:planta, p/p), o extrato de *S. brasiliensis* foi capaz de impedir o óbito dos camundongos até 120min de após a injeção da mistura (veneno de *B. jararacussu* + planta). Entretanto, na proporção de 1:10 (veneno:planta, p/p), o extrato de *S. brasiliensis* foi capaz de proteger os animais do óbito até 300min, que foi o tempo máximo de observação (Tabela 1). A injeção i.p. do extrato de *S. brasiliensis* (750 µg/animal) ou salina não foi capaz de provocar morte dos animais em até 300min de observação.

**Tabela 1:** Efeito do extrato da planta *S. brasiliensis* na letalidade causada pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

Grupos	Tempo de sobrevivência (min)
<i>B. jararaca</i> + salina	68 ± 0,3
<i>B. jararaca</i> + extrato (1:5)	300 ± 0,4*
<i>B. jararaca</i> + extrato (1:10)	300 ± 0,2*
<i>B. jararacussu</i> + salina	72 ± 0,1*
<i>B. jararacussu</i> + extrato (1:5)	120 ± 0,5*
<i>B. jararacussu</i> + extrato (1:10)	300 ± 0,2*

O veneno de *B. jararaca* (58 µg/animal) e *B. jararacussu* (75 µg/animal) foi incubado com salina (controle positivo) ou o extrato da planta *S. brasiliensis* na proporção de 1:5 ou 1:10 (veneno:planta, p/p), por 30min a 25 °C. Em seguida, a mistura foi injetada i.p. nos animais e, o tempo de sobrevivência foi monitorado. Os resultados expressam a média ± SEM (n=9). \*, significa que p<0,05 quando comparado ao controle (*B. jararaca* ou *B. jararacussu* + salina). O tempo máximo de sobrevivência dos camundongos foi de 300min, e aqueles animais que não foram a óbito foram eutanasiados.

#### 4.7.1. EFEITO DA PLANTA *S. brasiliensis* NA ATIVIDADE LETAL DO VENENO DE *B. jararaca* e *B. jararacussu* NO PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Os camundongos que receberam a injeção do veneno de *B. jararaca* (58 µg/animal) e *B. jararacussu* (75 µg/animal) por via i.p. e em seguida, administração de salina (controle positivo) morreram em 65 e 68min, respectivamente (Tabela 2). E, quando o veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foi injetado nos animais, e 30 min depois, o extrato da planta (580 ou 750 µg/animal, que corresponde a relação veneno:planta de 1:10) foi administrado i.p. ou por via i.v., os camundongos sobreviveram até 300min, que foi o tempo máximo de observação deste experimento (Tabela 2). Em compensação, quando o extrato foi administrado por via oral 30min após a injeção dos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, os camundongos morreram em cerca de 138 e 98min, respectivamente. Ressaltando que, após a injeção de todas as amostras, o tempo máximo de sobrevivência observado nesta atividade foi de 300min, e, que, após este tempo, os camundongos foram eutanasiados. Os animais que receberam apenas o extrato da planta *S. brasiliensis* ou salina não morreram até 300min de observação. Sendo assim, podemos observar que a administração do extrato da planta neste protocolo de tratamento por via i.v. ou i.p. foi mais eficiente em comparação à administração da planta por via oral.

**Tabela 2:** Efeito do extrato de *S. brasiliensis* na letalidade induzida pelos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

Grupos	Tempo de sobrevivida (min) i.p.	Tempo de sobrevivida (min) Oral	Tempo de sobrevivida (min) i.v.
<i>B. jararaca</i> + salina (controle positivo)	65 ± 0,3	65 ± 0,3	65 ± 0,3
<i>B. jararaca</i> + extrato	300 ± 0,2*	138 ± 0,1*	300 ± 0,2*
<i>B. jararacussu</i> + salina (controle positivo)	68 ± 0,3	68 ± 0,3	68 ± 0,3
<i>B. jararacussu</i> + extrato	300 ± 0,2*	98 ± 0,1*	300 ± 0,4*

O veneno de *B. jararaca* (58 µg/animal) e *B. jararacussu* (75 µg/animal) foi injetado por via intraperitoneal nos camundongos, e 30min depois, salina ou o extrato da planta *S. brasiliensis* (580 µg/animal ou 750 µg/animal) foi administrado por via i.p. (no mesmo local da injeção do veneno), via oral ou intravenosa (i.v.), e o tempo de sobrevivência (em min) dos animais foi monitorado. Os resultados expressam a média ± SEM de dois experimentos individuais (n = 6). \*, significa que p<0,05 quando comparado ao controle positivo (*B. jararaca* ou *B. jararacussu* + salina).

# CAPÍTULO II

## (DERIVADOS SINTÉTICOS)

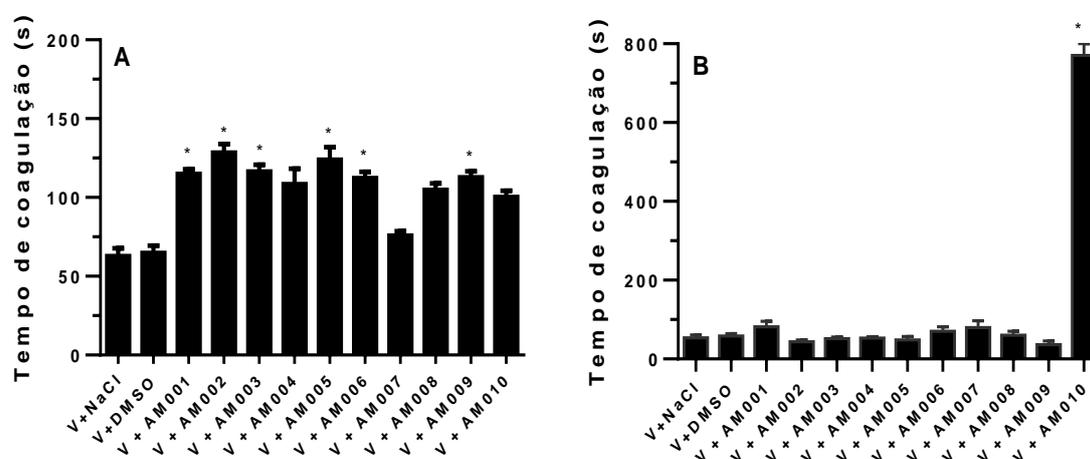
Este capítulo descreve o efeito de 10 moléculas derivadas do 1,2,3-triazol em inibir certas atividades tóxicas *in vitro* (coagulante, proteolítica e hemolítica) e *in vivo* (hemorrágica, edema e letal) causadas pelo veneno de *B. jararaca* no protocolo de incubação. Para o ensaio de hemorragia, o efeito de dois derivados foi analisado através dos protocolos de tratamento e prevenção. A eficácia dos derivados sintéticos na neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *B. jararaca* também fora avaliada em conjunto com o soro antibotrópico.

Além disso, a toxicidade dos 10 derivados sintéticos foi analisada e parâmetros farmacocinéticos através de ferramenta *in silico*.

Estes resultados foram publicados no periódico “Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Biosciences”. 2022; 29;77(11-12):459-471. doi: 10.1515/znc-2022-0010.

#### 4.8. EFEITO DOS DERIVADOS SINTÉTICOS 1,2,3-TRIAZOL NA ATIVIDADE COAGULANTE DO VENENO DE *B. jararaca*

O veneno de *B. jararaca* (37 µg/mL) coagulou o plasma ou fibrinogênio em aproximadamente 60 segundos, e esta quantidade de veneno foi designada como concentração mínima coagulante (CMC). Uma CMC (37 µg/mL) foi incubada com salina ou DMSO (controle positivo) ou com 370 µg/mL dos derivados sintéticos (AM001 – AM010) por 30min a 25°C. Em seguida, uma alíquota desta mistura foi adicionada ao plasma ou fibrinogênio e a coagulação foi monitorada, como descrito em métodos. Conforme mostrado na figura 28A, os derivados sintéticos AM001, AM002, AM003, AM005, AM006 ou AM009 prolongaram significativamente a coagulação do plasma causada pelo veneno de *B. jararaca*. E, a figura 28B mostra que o derivado sintético AM010 inibiu significativamente a atividade coagulante do fibrinogênio provocada pelo veneno de *B. jararaca*. Como controle negativo, os derivados sintéticos ou solventes (salina ou DMSO) isoladamente não promoveram a coagulação do plasma ou fibrinogênio (dados não mostrados).

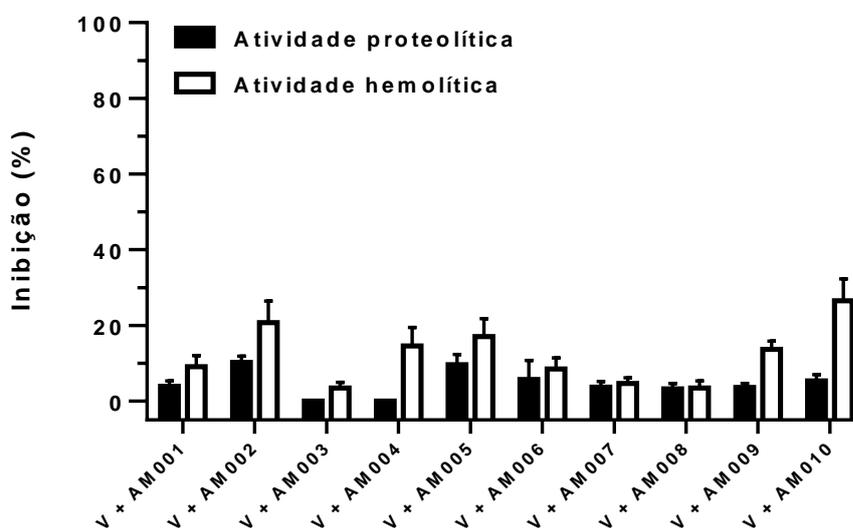


**Figura 28:** Efeito dos derivados 1,2,3-triazol na coagulação do plasma ou fibrinogênio induzida pelo veneno de *B. jararaca*.

O veneno (V) de *B. jararaca* (37 µg/mL) foi incubado por 30min a 25 °C com NaCl, DMSO ou com 370 µg/mL dos 10 derivados sintéticos (AM001 – AM010). Em seguida, a mistura foi adicionada ao plasma (A) ou fibrinogênio (B), e a coagulação foi monitorada, como descrito em método. Os resultados expressam a média ± SEM (n=6). \*, significa p<0,05 quando comparado com V+NaCl ou V+DMSO. V= veneno

#### 4.9. EFEITO DOS DERIVADOS SINTÉTICOS 1,2,3-TRIAZOL NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E HEMOLÍTICA DO VENENO DE *B. jararaca*

Como determinado em experimentos anteriores do capítulo I, a CMHI e CE do veneno de *B. jararaca* foi de 4,8 (Figura 19) e 3,9 µg/mL (Figura 17), respectivamente. E, essas concentrações do veneno de *B. jararaca* foram incubadas com os derivados sintéticos AM001 – AM010 na proporção veneno:derivado de 1:10 (p/p) por 30min a 25 °C. O percentual de inibição dos derivados nas atividades hemolítica e proteolítica está mostrado na figura 29. Os derivados AM002 e AM005 inibiram 10 e 20 % a proteólise e hemólise causada pelo veneno de *B. jararaca*, respectivamente (Figura 29). E, o AM010 inibiu cerca de 27 e 10 % a hemólise e proteólise. Os derivados AM002, AM004, AM006, AM008 e AM010 inibiram a atividade hemolítica de *B. jararaca* entre 10 e 25 %. E, somente o AM002 inibiu a atividade proteolítica em 10 %. Os derivados sintéticos AM003, AM007 ou AM008 não foram capazes de inibir ambas estas atividades de forma significativa (Figura 29), com percentuais de inibição menores do que 5 %. Os derivados sintéticos na ausência do veneno de *B. jararaca* não induziram proteólise ou hemólise (dados não mostrados).

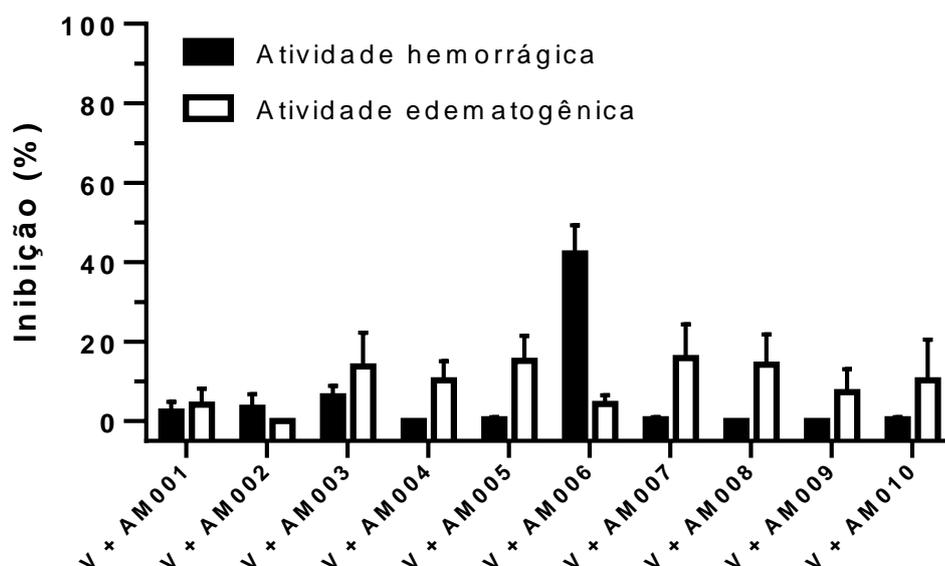


**Figura 29:** Efeito dos derivados 1,2,3-triazol nas atividades proteolítica e hemolítica causada pelo veneno de *B. jararaca*.

Os 10 derivados (AM001 – AM010) foram incubados com veneno de *B. jararaca* na proporção de 1:10, veneno:derivado (p/p). Em seguida, as atividades proteolítica e hemolítica foram avaliadas e as porcentagens de inibição das atividades proteolítica (colunas pretas) e hemolítica (colunas brancas) foram determinadas. Os resultados expressam a média ± SEM (n=6). V = veneno

#### 4.10. EFEITO DOS DERIVADOS SINTÉTICOS 1,2,3-TRIAZOL NA ATIVIDADE HEMORRÁGICA E EDEMATOGÊNICA DO VENENO DE *B. jararaca* NO PROTOCOLO DE INCUBAÇÃO

Os derivados 1,2,3-triazóis inibiram a hemorragia e o edema induzido pelo veneno de *B. jararaca* (22 µg/mL e 11 µg/mL, respectivamente). O derivado AM006 inibiu 42 % a hemorragia (Figura 30). Além disso, os derivados AM005, AM007 ou AM008 foram capazes de inibir em aproximadamente 15 % o edema (Figura 30). Por outro lado, os derivados AM004, AM008 ou AM009 não foram capazes de inibir a hemorragia, e o derivado AM002 não foi eficiente em impedir a formação do edema. Os derivados 1,2,3-triazóis isoladamente, ou seja, na ausência do veneno de *B. jararaca* (controle negativo) não foram capazes de promover hemorragia ou induzir edema (dados não mostrados).

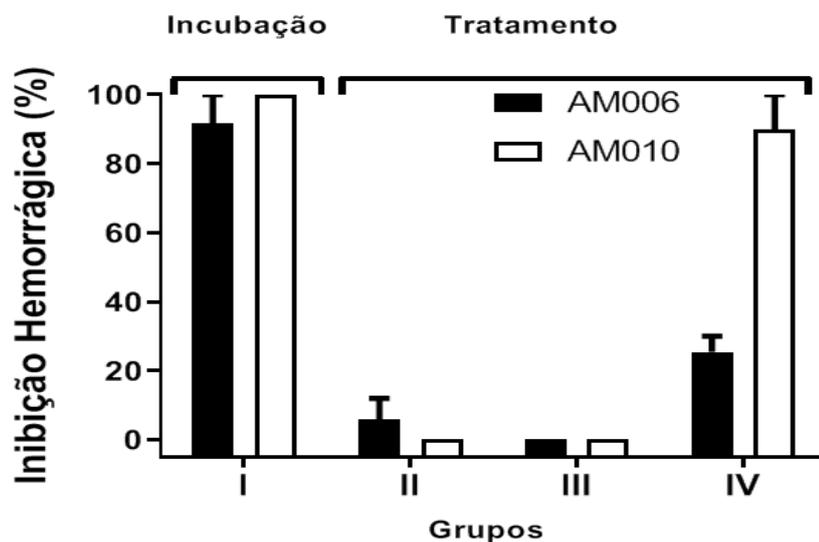


**Figura 30** Efeito dos derivados 1,2,3-triazóis na hemorragia e edema induzidos pelo veneno de *B. jararaca*.

Os dez derivados (AM001 – AM010) foram incubados com veneno (V) de *B. jararaca* na proporção de 1:10, veneno:derivado (p/p). Em seguida, as misturas foram injetadas nos camundongos e as atividades hemorrágica (colunas pretas) e edematogênica (colunas brancas) foram analisadas. Os resultados expressam a média ± SEM (n=6).

#### 4.10.1. EFEITO DOS DERIVADOS SINTÉTICOS 1,2,3-TRIAZOL NA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE *B. jararaca* NO PROTOCOLO DE TRATAMENTO

A figura 31 mostra o efeito somente dos derivados AM006 ou AM010 na hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* através do protocolo de tratamento, que consistiu na injeção do veneno, e em seguida, a administração do derivado. Estes derivados AM006 e AM010 foram selecionadas para este protocolo, devido aos seus resultados satisfatórios no protocolo de incubação nas atividades tóxicas *in vitro* e *in vivo*. Neste protocolo de tratamento, os animais receberam injeção s.c. do veneno de *B. jararaca* (22 µg/animal), e, após 10min, os derivados foram injetados s.c. no mesmo local de injeção do veneno (Figura 31, coluna preta, grupo II). Neste procedimento, o derivado AM006 inibiu 6 % a hemorragia; enquanto que o AM010 não foi capaz de inibir a hemorragia (Figura 31, coluna branca, grupo II). No grupo I, o derivado AM006 ou AM010 foi incubado previamente com o soro antibotrópico por 30min a 25 °C, e em seguida, uma alíquota desta mistura foi administrada nos animais e a hemorragia analisada (Figura 31, grupo I). Neste protocolo, o derivado AM006 inibiu 90 % e o AM010, 100 % a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* (Figura 31, grupo I). No grupo III, os derivados foram injetados por via s.c. e o soro antibotrópico por via i.v. E, neste caso, nenhum dos derivados foi eficiente em inibir a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* (Figura 31, grupo III). No grupo experimental IV, o veneno foi injetado nos animais e, após 10min, os derivados previamente incubados com o soro antibotrópico por 30min a 25 °C foram injetados s.c.. Os derivados AM006 e AM010 reduziram a hemorragia em 25 e 90 %, respectivamente neste grupo experimental (Figura 31, grupo IV).

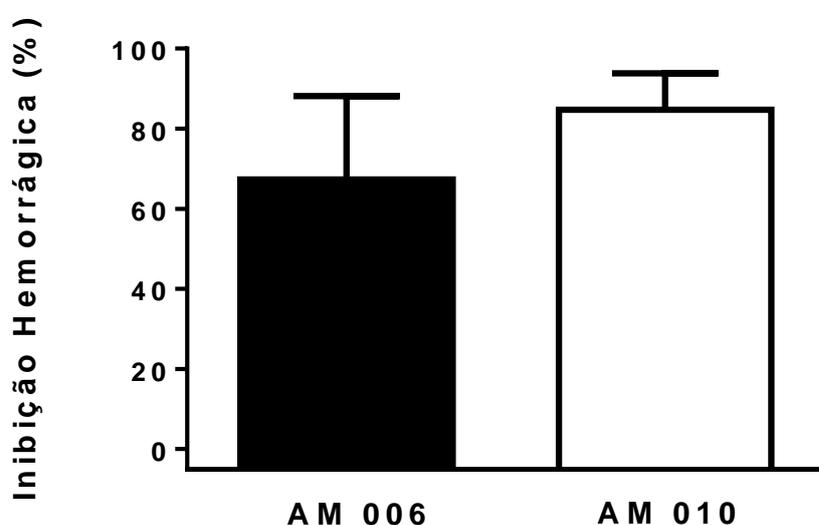


**Figura 31:** Efeito dos derivados 1,2,3 triazol AM006 ou AM010 em conjunto com o soro antibotrópico na hemorragia induzida pelo veneno de *B. jararaca*.

Protocolo de incubação - Grupo I, os 10 derivados AM006 ou AM010 (220 µg/mL) foram incubados por 30min com veneno de *B. jararaca* (22 µg/mL) e soro antibotrópico. Em seguida, a mistura foi injetada por via subcutânea (s.c.) na pele dos abdomens dos camundongos. Protocolo de tratamento - Grupo II, o veneno de *B. jararaca* foi injetado s.c., e após 10min, os derivados AM006 ou AM010 foram administrados por via s.c. e no mesmo local de injeção do veneno. Grupo III, o veneno de *B. jararaca* foi injetado por via s.c. e, após 10min, os derivados sintéticos foram administrados por via s.c. e o soro antibotrópico por via intravenosa. Grupo IV, o veneno de *B. jararaca* foi injetado por via s.c., e após 10min, os derivados previamente incubados com soro antibotrópico foram administrados por via s.c. (no mesmo local do veneno). Os resultados expressam a média ± SEM (n=6).

#### 4.10.2 EFEITO DOS DERIVADOS SINTÉTICOS 1,2,3-TRIAZOL NA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO DE *B. jararaca* NO PROTOCOLO DE PREVENÇÃO

Neste protocolo, o derivado AM006 ou AM010 (220 µg/animal) ou solventes foram administrados nos animais por via s.c., e 10min depois, o veneno de *B. jararaca* (22 µg/animal) foi injetado pela mesma via e no mesmo local de injeção dos derivados. O derivado AM006 ou AM010 inibiu 68 e 85 % a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca* (Figura 32). Entretanto, não há diferença significativa entre os dois percentuais de inibição. Os animais que receberam a injeção dos derivados ou solventes na ausência do veneno não houve hemorragia (dados não mostrados).



**Figura 32:** Efeito dos derivados AM006 ou AM010 na hemorragia induzida pelo veneno de *B. jararaca* no protocolo de prevenção.

Os 10 derivados AM006 ou AM010 (220 µg/animal) foram injetados por via s.c. nos camundongos; e 10min depois, o veneno de *B. jararaca* (22 µg/mL) foi injetado por via s.c. e no mesmo local da injeção dos derivados. Em seguida, a atividade hemorrágica foi analisada, conforme método. Os resultados expressam a média ± SEM (n=6).

#### 4.11. EFEITO DOS DERIVADOS SINTÉTICOS 1,2,3-TRIAZOL NA ATIVIDADE LETAL DO VENENO DE *B. jararaca* NO PROTOCOLO DE INCUBAÇÃO

Os camundongos injetados com veneno de *B. jararaca* (58 µg/animal) morreram em cerca de 100min (Tabela 3, *B. jararaca* + salina – controle positivo). Quando o veneno de *B. jararaca* foi incubado com o derivado AM010, na proporção de 1:10 (veneno:derivado, p/p), os camundongos sobreviveram até 300min (Tabela 3), que foi o tempo máximo de observação. Além disso, os derivados AM003, AM004, AM006, AM007 ou AM008 também foram capazes de aumentar o tempo de sobrevivência dos animais, em até 250min (Tabela 3). O derivado AM009 não foi capaz de prevenir a atividade letal causada pela injeção do veneno de *B. jararaca*. O tempo máximo de sobrevivência observado nesta atividade foi de 300min. Após este tempo, os camundongos que sobreviveram foram eutanasiados. Para o controle negativo, os camundongos receberam a injeção i.p. dos 10 derivados 1,2,3-triazóis ou solventes (salina ou DMSO), na ausência do veneno. E, em ambos os casos, os derivados ou solventes não levaram nenhum animal a óbito (dados não mostrados).

**Tabela 3:** Efeito dos 10 derivados 1,2,3-triazóis na atividade letal causada pelo veneno de *B. jararaca*.

Grupos	Tempo de sobrevivência (min)
<i>B. jararaca</i> + salina	100 ± 0.2
<i>B. jararaca</i> + AM001	220 ± 0.1*
<i>B. jararaca</i> + AM002	180 ± 0.3*
<i>B. jararaca</i> + AM003	270 ± 0.2*
<i>B. jararaca</i> + AM004	270 ± 0.3*
<i>B. jararaca</i> + AM005	180 ± 0.6*
<i>B. jararaca</i> + AM006	260 ± 0.2*
<i>B. jararaca</i> + AM007	255 ± 0.3*
<i>B. jararaca</i> + AM008	280 ± 0.4*
<i>B. jararaca</i> + AM009	80 ± 0.5
<i>B. jararaca</i> + AM010	300 ± 0.1*

Os dez derivados (AM001 – AM010) foram incubados com veneno de *B. jararaca* (58 µg/animal) por 30min a 25 °C, e, em seguida a mistura foi injetada i.p. nos animais e o tempo de sobrevivência foi monitorado. Os resultados expressam a média ± SEM (n=6). \*, significa que p<0,05 quando comparado ao controle positivo (*B. jararaca* + salina). O tempo máximo de monitoramento dos animais foi de 300min, e, em seguida, os animais foram eutanasiados.

## 4.12. TOXICIDADE DOS DERIVADOS SINTÉTICOS 1,2,3-TRIAZOL

### 4.12.1. ANÁLISE *in vivo*

A injeção i.p. de dose única dos dez derivados (700 µg/animal) ou DMSO (0,9 % v/v, concentração final) não promoveu morte nos camundongos durante 48 horas de observação (dados não mostrados). Ao final deste período, os animais foram eutanasiados.

### 4.12.2. ANÁLISE *in silico*

O perfil de toxicidade dos 10 derivados AM001, AM002, AM003, AM004, AM005, AM006, AM007, AM008, AM009 ou AM010 foi avaliado *in silico* utilizando a ferramenta “online” AdmetSAR, e o resultado está mostrado no quadro 3. Os derivados apresentaram peso molecular entre 175.19 – 290.15, e dessa forma, todos os derivados estão no intervalo estabelecido neste critério de peso molecular (86-829 kDa), permeabilidade, difusão e transporte através do sangue ou para dentro das células. Todos os derivados obtiveram resultados positivos para os parâmetros: Absorção Intestinal Humana (HIA), Barreira Hematoencefálica (BBB) e permeabilidade de células Caco-2 (Caco-2), ou seja, todos os derivados têm indicação de serem absorvidos pelo trato gastrointestinal, podem atravessar a barreira hematoencefálica e têm permeabilidade nas células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2). Todos os 10 derivados 1,2,3-triazol obtiveram resultados negativos para o teste de Ames e carcinogenicidade, ou seja, os derivados não apresentam mutagenicidade e potencial carcinogênico. Além disso, os derivados sintéticos não apresentaram resultados positivos para hepatotoxicidade, e dessa forma, não causariam danos ao fígado, exceto os derivados AM005, AM008, AM009 ou AM010, que apresentaram resultados positivos (Quadro 3). Para o critério LogS (que indica solubilidade em água), os 10 derivados sintéticos mostraram-se solúveis em água, pois apresentaram valores  $\geq -5,0$ . Ressalta-se que o valor de referência é  $\geq -5,0$ . Para o critério AlogP (que indica lipofilicidade), os 10 derivados apresentarem resultados entre -4 a + 8,33, ou seja, todos os derivados apresentam característica lipofílica, podendo atravessar as

membranas biológicas do trato gastrointestinal permitindo assim uma absorção destes derivados se administrados por via oral (Quadro 3).

**Quadro 3:** Análise *in silico* dos derivados sintéticos (AM001 – AM010) através da ferramenta AdmetSAR.

Derivado	MW	LogP	LogS	HIA	Caco2	BBB	Carcino	Ames	Hepato
AM001	237.6	2.15	-3.54	+	+	+	-	-	-
AM002	272.1	2.80	-3.68	+	+	+	-	-	-
AM003	203.5	1.49	-2.43	+	+	+	-	-	-
AM004	217.7	1.80	-2.69	+	+	+	-	-	-
AM005	237.9	2.15	-3.54	+	+	+	-	-	+
AM006	237.9	2.15	-3.68	+	+	+	-	-	-
AM007	259.9	1.66	-3.15	+	+	+	-	-	-
AM008	193.8	0.90	-2.23	+	+	+	-	-	+
AM009	175.9	0.76	-1.26	+	+	+	-	-	+
AM010	290.5	4.24	-4.44	+	+	+	-	-	+

MW = Molecular Weight (Peso Molecular); HIA = Human Intestinal Absorption (Absorção Intestinal Humana); BBB = Blood Brain Barrier (Barreira Hematoencefálica); Carcino, carcinogenicidade; Hepato, hepatotóxico; (+), positivo e (-), negativo.

Ferramenta “on line” AdmetSAR versão 2.0 (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>).

**Quadro 4:** Resumo dos resultados do extrato da planta *Schwartzia brasiliensis* e dos dez derivados 1,2,3-triazóis nas atividades coagulante, proteolítica, hemolítica, hemorrágica, edematogênica e letal no protocolo de incubação.

ATIVIDADES (Protocolo de incubação)						
<i>in vitro</i>			<i>in vivo</i>			
Coagulante	Proteolítica	Hemolítica	Hemorragia	Edema	Letal	
PLANTA						
SB + BJA (1:5)	+	80%	66%	70%	38%	300min
SB + BJA (1:10)	+	81%	39%	77%	53%	300min
SB + BJU (1:5)	+	79%	NT	85%	63%	120min
SB + BJU (1:10)	+	70%	NT	100%	71%	300min
DERIVADOS						
AM001 + BJA	+	4%	9%	2%	4%	220min
AM002 + BJA	+	10%	21%	3%	0%	180min
AM003 + BJA	+	0%	3%	6%	14%	270min
AM004 + BJA	-	0%	15%	0%	10%	270min
AM005 + BJA	+	9%	17%	1%	15%	180min
AM006 + BJA	+	6%	8%	42%	4%	260min
AM007 + BJA	-	4%	5%	1%	16%	255min
AM008 + BJA	-	3%	3%	0%	14%	280min
AM009 + BJA	+	4%	14%	0%	7%	80min
AM010 + BJA	-	5%	27%	1%	10%	300min

SB, *S. brasiliensis*; BJA, *B. jararaca*; BJU, *B. jararacussu*; (+) Prolongou tempo de coagulação; (-) não prolongou tempo de coagulação. Os valores para as atividades proteolítica, hemolítica, hemorrágica e edematogênica estão representados como percentual de inibição. A atividade letal está representada como tempo de sobrevivência em minutos. O tempo de sobrevivência do controle positivo (veneno + salina ou veneno + DMSO) foi cerca de 60-70 min e não está mostrado no quadro. NT, Não Testado.

## 5. DISCUSSÃO

O acidente ofídico entrou para lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) em 2009, por ser um importante problema de saúde pública (BAGCCHI, 2015), mas em 2013 foi retirado, e em 2015 foi novamente incluído pela OMS. Entretanto, diferente de outras DTNs, como doença de Chagas, Dengue, a erradicação do envenenamento por picadas de serpentes é impossível, pois as serpentes desempenham papel importante no controle de roedores. O tratamento mundialmente utilizado para acidentes ofídicos é feito através da administração da soroterapia (antiveneno) (GUTIÉRREZ, 2002), que é eficaz contra o óbito, visto pela baixa letalidade destes acidentes quando comparado ao número de casos mundialmente relatados. Entretanto, a soroterapia não é eficaz na reversão dos efeitos locais, principalmente para bloquear a destruição dos tecidos, o que invariavelmente leva a necrose, deformidade ou em casos mais graves, a amputação do membro acometido pela picada. Além disso, a soroterapia pode produzir efeitos adversos, como febre e choque anafilático, que podem chegar a 30% dos casos (SAAVEDRA *et al.*, 2018; SCHESKE *et al.*, 2015; GUTIÉRREZ *et al.*, 1998). Os antivenenos são usados há mais de cem anos, mas poucas modificações foram realizadas no processo de fabricação ao longo desse tempo (LALLOO & THEAKSTON, 2003). Por este motivo é de grande importância novos estudos na procura por novas moléculas e/ou tratamento que possam auxiliar a soroterapia, principalmente no bloqueio dos efeitos locais e sem produzir efeitos colaterais.

Alguns trabalhos do nosso grupo de pesquisa, LAVENOTOXI demonstraram o papel antiofídico das algas marinhas (DA SILVA *et al.*, 2018), derivados sintéticos (CAMPOS *et al.*, 2009; DOMINGOS *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2020) e plantas (DA SILVA *et al.*, 2019). Na medicina tradicional em diversas partes do mundo, as plantas vêm sendo usadas como antivenenos (MORS *et al.*, 2000); entretanto a validação científica deste uso é pouco investigada, e ainda mais o desenvolvimento de um fitoterápico como antiveneno com validação científica. Então, é neste contexto que o presente trabalho buscou avaliar a capacidade da planta *S. brasiliensis* e de dez moléculas obtidas por síntese orgânica derivadas do 1,2,3-triazol na inibição de

algumas atividades tóxicas do veneno das serpentes *B. jararaca* e *B. jararacussu*, pois são espécies de serpentes responsáveis pela maior frequência de acidentes no Brasil e em outros países da América do Sul. As atividades estudadas são consideradas as mais importantes nos efeitos tóxicos observados no envenenamento. A planta *S. brasiliensis* é usada para tratar doenças cardiovasculares (AGRA *et al.*, 2007), mas o potencial contra atividades tóxicas de veneno de serpentes desta espécie não fora relatado previamente na literatura, o que torna a prospecção desta planta como antiveneno inédita.

De Moura *et al.*, (2015) descreveram o uso de 24 espécies de plantas como antiveneno, e 29% destas mostraram resultados promissores como antiveneno. Esta pesquisa nos mostra o potencial da flora brasileira tem potencial para a descoberta de bioativos com eficácia na neutralização de atividades tóxicas causadas por venenos de serpentes. Ressalta-se que a parte do vegetal influencia nessa propriedade antiveneno. As partes das plantas mais frequentemente utilizadas na medicina popular e por artigos científicos são as folhas e as cascas. Em especial as folhas, pois são de fácil manipulação e coleta, evitando desmatamento e desperdício do vegetal (VÁSQUEZ *et al.*, 2015). O uso de plantas como tratamento para envenenamento por serpentes por povos nativos ou comunidades em geral se dá através de infusões ou chás, e em geral, se usa água ou álcool como solventes. Contudo, a escolha do solvente (polar ou apolar) para preparar os extratos vegetais também deve ser considerada, pois diferentes compostos de plantas são extraídos de acordo com o solvente. Dessa forma, neste trabalho escolhemos o extrato aquoso da folha da planta *S. brasiliensis* como antiveneno, pois o solvente água é o mais fácil para uma possível ingestão de uma formulação feita a partir desta planta. De fato, extratos aquosos de plantas podem ser mais fáceis para desenvolver formas farmacêuticas de fitoterápicos ou fitofármacos, bem como o seu uso por comunidades localizadas longe dos grandes centros urbanos, e às vezes sem energia elétrica. Sem dúvida, a água é o solvente mais fácil de obtenção por tais povos, tornando possível o preparo do medicamento por infusão, chás ou outro preparado da planta.

Um trabalho testou a eficácia de extratos aquosos das folhas e cascas de uma planta nativa da Amazônia brasileira, *Aniba fragans* contra efeitos tóxicos do veneno da serpente *Bothrops atrox*. Esta espécie de planta é utilizada na medicina popular

para o tratamento de envenenamento por serpentes (DE MOURA *et al.*, 2018). Além da Amazônia brasileira, outros biomas possuem muitas outras espécies que são utilizadas por pessoas para tratar envenenamento por picada de serpentes (DE MOURA *et al.*, 2015; STRAUCH *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016) e demais enfermidades.

O extrato da planta *S. brasiliensis* é rica em componentes fenólicos, com uma diversidade na estrutura química, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinos. Os flavonóides estão amplamente distribuídos no reino vegetal e possuem efeitos benéficos à saúde humana, como anticâncer, antimutagênico, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante e tripanocida (FIALHO *et al.*, 2016). As plantas de uma maneira geral produzem metabólitos, classificados em primários e secundários que são moléculas com diversidade química e com várias propriedades biológicas e farmacológicas (TEIXEIRA, 2009). Os metabólitos primários são moléculas essenciais à vida dos organismos, e são os polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Os metabólitos secundários, também chamados de complementares são uma gama de substâncias orgânicas, como pigmentos, hormônios, feromônios e defensivos químicos. Esse metabolismo depende do metabolismo primário, que leva a produção de alguns compostos, como terpenos, alcalóides, taninos, flavonóides e ligninas (TEIXEIRA, 2009). Diversas propriedades farmacológicas, como antiviral, anti-inflamatório e antiveneno têm sido atribuídas a estes metabólitos secundários.

Os venenos de serpentes de uma maneira geral são ricos em proteases, metaloproteases, serinoproteases, hialuronidasas, nucleotidasas e fosfolipases, que estão diretamente ligadas aos efeitos tóxicos do envenenamento, como perda do membro, morbidade ou morte. Os flavonóides tem mecanismo de ação baseado em sua capacidade de ligar metais ou em macromoléculas, bloqueando assim a ação das toxinas (CASTRO *et al.*, 1999; CARO *et al.*, 2017; PITHAYANUKUL *et al.*, 2005). É sabido que as enzimas do veneno (macromoléculas) apresentam metais ligados à sua estrutura, em geral  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ . Dessa maneira, o efeito neutralizante do extrato de *S. brasiliensis* contra as principais atividades tóxicas dos venenos neste trabalho pode estar relacionado com a ação quelante destes metais ou a ligação às toxinas do veneno (FREITAS DE SOUSA *et al.*, 2015; CHARVAT *et al.*, 2018).

Em geral, o protocolo utilizado nos estudos de prospecção de moléculas com potencial antiveneno é feito através da incubação destas moléculas com o veneno da serpente em estudo. Este procedimento experimental é chamado de protocolo de incubação. E, após a incubação planta:veneno, as atividades tóxicas são realizadas. Além disso, o antiveneno comercial é igualmente testado usando este procedimento; entretanto somente a atividade letal é realizada. Este teste realizado para os antivenenos é chamado de teste de potência. Aqueles antivenenos que obtiverem resultado satisfatório no teste de potência são envasados e distribuídos para os hospitais de referência no País (WHO, 2013).

Este protocolo de incubação não reflete uma real situação de envenenamento, pois na realidade o tratamento é feito após a inoculação do veneno na vítima. E, dessa forma, no presente trabalho, nós avaliamos o potencial antiveneno da planta e dos derivados sintéticos realizando um outro protocolo experimental, designado de “tratamento” (DA SILVA *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2019). Neste, o veneno foi injetado em camundongos, e, em seguida, o extrato da planta ou derivado era administrado. Este método se parece mais com uma situação de envenenamento. Para este procedimento, as atividades *in vivo* hemorrágica, edematogênica e letal foram realizadas, pois são atividades importantes nos sintomas do envenenamento, além do óbito (DA SILVA *et al.*, 2007).

Além de realizar este protocolo que simula uma situação real de um acidente ofídico e o procedimento adotado na clínica, investigamos a eficácia da administração da planta ou derivados usando diferentes vias de administração (subcutânea, oral ou intravenosa) bem como o tempo de injeção (30min). As abordagens das vias de administração e o tempo de injeção são parâmetros extremamente importantes para o desenvolvimento de um tratamento, pois a maneira de administração de um medicamento depende de alguns fatores bioquímicos, fisiológicos ou farmacológicos, e, obviamente, a natureza química do medicamento direciona a forma de administração. A administração do medicamento à base da planta ou derivado por via oral facilita o seu uso (podendo ser na forma de chás ou infusões), mas deve-se levar em consideração o efeito de primeira passagem, absorção gastrointestinal e outros parâmetros que possam diminuir a concentração do medicamento, afetando dessa forma sua eficácia (DA SILVA *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2020; DA SILVA *et al.*, 2019).

Na medicina tradicional e clássica (oriental ou ocidental), a via oral é mais habitual e simples. O tempo de administração do tratamento é igualmente importante, pois é sabido que a demora na injeção do antiveneno comercial influencia na prevenção do óbito, mas principalmente, na reversão dos efeitos tóxicos locais, como a necrose tecidual que pode levar a amputação do membro acometido pela picada (DE MOURA *et al.*, 2015; STRAUCH *et al.*, 2013). Esta questão do tempo de administração do antiveneno no Brasil é de extrema relevância já que nosso País tem uma grande extensão territorial (8.516.000 km<sup>2</sup>) e muitas áreas não tem rede elétrica ou são deficitárias, as estradas inexistentes ou são de péssima qualidade que dificulta o acesso aos grandes centros onde existe o tratamento e o suporte médico adequado para envenenamento por serpentes. A grande distância e a dificuldade até estes grandes centros retardam o uso dos antivenenos, aumentando a possibilidade de amputações ou morbidade no membro (SAAVEDRA *et al.*, 2018; SCESKE *et al.*, 2015; GUTIÉRREZ *et al.*, 1998).

A investigação da utilização da via subcutânea é importante, pois as serpentes brasileiras e da América do Sul, em geral, possuem uma ação local muito intensa, como dito anteriormente (WARRELL, 2004). E, dessa forma, a administração de um medicamento no local da picada é de extrema importância na reversão rápida de tais efeitos. De fato, povos indígenas usam medicamentos à base de planta na forma de emplastro. Por outro lado, a injeção intravenosa já requer cuidados médicos especiais, mas é a via de escolha do atual tratamento para acidentes ofídicos, que é feito através do soro antiofídico (antiveneno) (SILVA *et al.*, 2016). Para uma região remota, esta via intravenosa não seria uma melhor escolha. Mas, a investigação desta via para o uso de produtos naturais é de extrema relevância para que possa ser também usado em centros hospitalares com segurança e que não afeta a eficiência dos antivenenos através uma complexação dos componentes químicos da planta com as proteínas do antiveneno.

Como foi observado nos resultados, a realização do protocolo de tratamento, onde o extrato da planta é administrado após os venenos, reduziu a atividade hemorrágica de *B. jararacussu* de forma mais eficaz do que a hemorragia induzida por *B. jararaca*, principalmente utilizando a via subcutânea e intravenosa (> 50%). Em contrapartida, o extrato da planta foi mais eficaz na neutralização da atividade

edematogênica induzida pelo veneno de *B. jararaca*. Além destas duas atividades tóxicas (edema e hemorragia), o extrato da planta foi eficaz em inibir a letalidade, aumentando assim o tempo de sobrevivência dos camundongos, principalmente quando a planta foi administrada por via oral e intravenosa.

Sendo assim, nossos resultados demonstram que a utilização do extrato da planta *S. brasiliensis* pode melhorar ou complementar a eficácia do antiveneno, diminuindo os efeitos locais ou sistêmicos provocados pela ação do veneno. Consequentemente, o extrato da planta *S. brasiliensis* tem potencial para o desenvolvimento de um futuro fitoterápico para o tratamento do envenenamento por serpentes da espécie *B. jararaca* e *B. jararacussu*. Além do que, a planta não se mostrou tóxica nos testes de toxicidade *in vivo* ou *in vitro* e já é usada como planta medicinal para malária, dengue e doenças cardíacas.

Além do uso de produtos naturais para diferentes enfermidades e doenças negligenciadas, a literatura científica relata a investigação no uso de moléculas obtidas por síntese orgânica para o tratamento de doenças (DE ALVARENGA *et al.*, 2011; STRAUCH *et al.*, 2019; CASTAÑEDA *et al.*, 2019). Nesta tese, também investigamos o uso de moléculas sintéticas obtidas a partir do 1,2,3-triazol, que vem sendo amplamente na literatura científica como anticâncer, antioxidante, antiviral, dentre outras. O LAVENOTOXI vem há algum tempo colaborando com este potencial farmacológico dos triazóis, e evidenciando esta estrutura como antiveneno (DE SOUZA *et al.*, 2022; AMORIM *et al.*, 2022; CHAZIN *et al.*, 2022). Campos *et al.* (2009) mostraram o efeito de derivados 1,2,3-triazóis contra os efeitos tóxicos do veneno da serpente *Lachesis muta*. Estes derivados sintéticos foram capazes de inibir a atividade hemolítica do veneno bruto da serpente *L. muta* e uma enzima PLA2 isolada deste veneno. Além disso, Domingos *et al.* (2013) demonstraram o potencial de inibição de 1,2,3-triazóis nas atividades proteolítica, hemolítica, coagulante e edematogênica contra a atividades tóxicas dos venenos das serpentes *B. jararaca* e *L. muta*. Em resumo, estes derivados sintéticos obtiveram resultados inibitórios promissores.

Alguns derivados 1,2,3-triazóis (AM001, AM002, AM003, AM004, AM005, AM006) utilizados nesta tese já foram descritos no trabalho de Moura *et al.* (2016) como anticoagulantes e antiplaquetários. Além do mais, da Silva *et al.* (2020), evidenciaram o potencial de outros derivados sintéticos 1,2,3-triazóis (AM11, AM12,

AM13, AM14, AM15, AM16, AM17, AM18, AM19) contra efeitos tóxicos do veneno da serpente da espécie *B. jararaca*. Os derivados foram capazes de inibir as atividades coagulante, hemolítica, proteolítica, hemorrágica e edematogênica do veneno de *B. jararaca* e também avaliaram sua toxicidade utilizando a ferramenta admetSAR. Todos os derivados foram eficientes em inibir as atividades tóxicas do veneno de *B. jararaca* com diferentes eficiências nos protocolos de incubação e tratamento. Estes derivados também não apresentaram toxicidade *in silico*.

Os dez derivados sintéticos utilizados nesta tese designados de AM001, AM002, AM003, AM004, AM005, AM006, AM007, AM008, AM009 e AM010 foram capazes de prolongar o tempo de coagulação causados pelo veneno da serpente *B. jararaca*. Algumas toxinas presentes no veneno desta espécie causam distúrbios hemostáticos, como enzimas pró-coagulantes, enzimas tipo-trombina, enzimas fibrinogenolítica, ativadores da proteína C e proteínas lectina tipo C (SENISE *et al.*, 2015). Este efeito inibitório dos derivados na coagulação causada pelo veneno pode ser em função de uma ligação com as enzimas-alvo dos venenos, principalmente com aquele do tipo-trombina ou outras proteases. A interação dos derivados com proteases dos venenos pode se dá de forma direta ou através da quelação de metais importantes para a atividade catalítica das proteases. Sem dúvida, ocorre uma interação dos derivados com proteases, pois algumas atividades tóxicas dos venenos, como proteolítica, edematogênica, letalidade, que foram estudadas nesta tese dependem da participação desta classe de enzimas (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989).

Para os estudos antivenenos com os derivados, os protocolos de incubação, tratamento e prevenção também foram realizados. E, os dez derivados sintéticos foram eficazes na inibição das principais atividades tóxicas no protocolo de incubação. Para os estudos buscando moléculas antiveneno, a realização dos protocolos de tratamento e prevenção é de extrema relevância e vêm sendo regularmente investigados na literatura científica, o que demonstra uma preocupação para melhorar os testes com moléculas candidatas a antiveneno (DA SILVA *et al.*, 2016). Dessa forma, o efeito dos derivados AM006 e AM010 usando esses dois protocolos foi investigado somente na atividade hemorrágica. Esta escolha dos derivados se deveu, pois foram aqueles mais eficazes no protocolo de incubação. No protocolo de tratamento, AM006 inibiu cerca de 6% a hemorragia, e AM010 não inibiu. Dessa forma, neste

procedimento que injeção dos derivados após a injeção do veneno, os derivados foram ineficazes de proteger os animais da hemorragia causada pelo veneno da serpente. Diferente do resultado obtido no protocolo de incubação, que a inibição foi cerca de 90%. Entretanto, quando o antiveneno foi misturado aos derivados, a inibição da hemorragia foi de 25 e 90% para AM006 e AM010, respectivamente. Este é resultado extremamente interessante, pois revela um efeito aditivo do derivado na presença do antiveneno. Ressalta-se que o derivado ou o soro isoladamente não inibiu a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca*. Resultado igualmente promissor foi quando os derivados foram injetados antes da injeção do veneno de *B. jararaca* (protocolo de prevenção) A inibição da hemorragia foi de 60 e 90% para AM006 e AM010, respectivamente. Este protocolo de prevenção não pode ser usado desta forma como tratamento, já que o derivado foi administrado antes da injeção do veneno, que de fato não é a situação real de envenenamento. Entretanto, esse é um resultado positivo e promissor, pois ambos os derivados poderiam ser usados como uma profilaxia e que poderia reduzir os efeitos tóxicos do envenenamento caso um trabalhador entrasse em uma região onde tem adensamento populacional de serpentes peçonhentas, ou até mesmo para soldados das forças armadas que fazem treinamento em locais onde há serpentes peçonhentas. Este efeito aditivo dos derivados somado ao soro antibotrópico (antiveneno) foi igualmente promissor, pois o antiveneno é o tratamento disponível e aceito por órgãos de saúde nacional e internacional, como a OMS e desta forma, qualquer tratamento alternativo aos antivenenos deve ter um efeito somatório na inibição dos efeitos tóxicos causados por veneno de serpentes e que não interfira na ação dos antivenenos. Infelizmente, no protocolo de tratamento, os derivados AM006 e AM010 não foram eficazes nas condições testadas nesta tese, talvez aumentar a concentração do derivado e investigar outros tempos ou vias de administração dos derivados.

Os derivados avaliados nesta tese não foram tóxicos analisados por experimentos *in vitro*, *in vivo* e ferramenta *in silico*, admetSAR. Esta técnica *in silico* foi desenvolvida para previsão e otimização das propriedades químicas de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade; daí o termo ADMET. Estas propriedades são de extrema importância nas pesquisas visando à descoberta e desenvolvimento de um novo medicamento. Torna-se de grande relevância o uso do

método *in silico* a fim de avaliar de modo preliminar as propriedades das moléculas candidatas a fármaco objetivando filtrar as melhores candidatas com a avaliação de riscos ambientais e a saúde humana (YANG *et al.*, 2018); além de reduzir o número de animais utilizados nos ensaios de toxicidade *in vivo*. Entretanto, os métodos *in vitro* e *in vivo* sejam ainda de extrema relevância neste propósito.

Os dez derivados 1,2,3-triazóis estudados nesta tese obtiveram resultados *in silico* dentro do esperado pela ferramenta admetSAR, obtiveram peso molecular dentro da referência (86-829), apresentaram resultados positivos para absorção intestinal, da barreira hematoencefálica e permeabilidade nas células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2). Nenhum derivado apresentou mutagenicidade e potencial carcinogênico. Os derivados não manifestaram hepatotoxicidade, exceto as amostras AM005, AM008, AM009 e AM010. Além disto, os dez derivados mostraram-se solúveis em água e com características lipofílicas, que são importantes parâmetros para a escolha da via de administração de um fármaco. Assim, os derivados cumpriram todos esses requisitos previstos nesta ferramenta para um possível medicamento administrado por via oral em humanos. A análise *in silico* demonstrou que os derivados não são tóxicos para células hepáticas nem possuem potencial carcinogênico ou mutagênico. Por outro lado, os derivados AM005, AM008, AM009 e AM010 demonstram alguma hepatotoxicidade. Mas, de Souza *et al.* (2022) avaliaram a toxicidade *in vivo* pelo teste dose aguda e nenhum derivado foi tóxico, ou seja, nenhum deles provocou morte nos animais nas condições experimentais testadas. Neste trabalho, de de Souza *et al.* (2022), a dose dos derivados foi relativamente maior do que qualquer dose usada nos ensaios *in vivo* de hemorragia, edema ou letalidade.

Sendo assim, os dez derivados triazólicos e a planta *S. brasiliensis* se mostraram promissores na inibição dos efeitos tóxicos causados pelo veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*. Portanto, são moléculas promissoras para um tratamento complementar à soroterapia atual.

Entretanto, para compreender os mecanismos inibitórios da planta e derivados são necessários experimentos complementares.

## 6. CONCLUSÕES

O extrato aquoso da planta *Schwartzia brasiliensis* foi capaz de inibir as atividades tóxicas *in vitro* (coagulante, proteolítica e hemolítica) e atividades *in vivo* (hemorrágica, edematogênica e letal) causadas pelo veneno das serpentes *B. jararaca* ou *B. jararacussu*.

Os derivados 1,2,3-triazóis foram eficazes em inibir algumas atividades tóxicas avaliadas no presente trabalho, como atividade *in vitro* (coagulante, proteolítica e hemolítica) e atividades *in vivo* (hemorrágica, edematogênica e letal) causadas pelo veneno da serpente *B. jararaca*. Assim como, os derivados apresentaram resultados promissores na avaliação da toxicidade a partir do método *in silico*.

Sendo assim, os resultados sugerem que o extrato aquoso da planta *Schwartzia brasiliensis* é uma ferramenta biotecnológica importante na neutralização dos efeitos tóxicos dos venenos das serpentes *B. jararaca* e *B. jararacussu*, possibilitando assim uma ferramenta promissora para o tratamento dos acidentes provocados por tais serpentes. Tal como, os derivados 1,2,3-triazóis apresentaram eficácia contra atividades tóxicas causadas pelo veneno de *B. jararaca*, nos métodos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. Estes poderiam ser usados para complementar o atual tratamento antiveneno.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAJB. Associação de Amigos do Jardim Botânico. Caminhada da floração. 2020. Disponível em: <https://www.amigosjb.org.br/wp-content/uploads/2020/12/FLORA%C3%87%C3%83O-DEZEMBRO-2020-compactado.pdf> Acesso em: 13 de Novembro de 2023.

Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJ, Coelho VP. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 111(2):383-95.

Agra MF, Silva KN, Basilio IJL, de Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil Brazilian. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18 (3).

Al-Abdulla I, Garnvwa JM, Rawat S, Smith DS, Landon J, Nasidi A. Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). *Toxicon*. 2003; 42:399e404.

Alfob/CFF. Associação dos Laboratórios Farmacêuticos Oficiais do Brasil. Conselho Federal de Farmácia. Laboratórios farmacêuticos oficiais do Brasil / Associação dos Laboratórios Farmacêuticos Oficiais do Brasil. 2019. Disponível em: <https://www.cff.org.br/userfiles/LFOBs%20Versao%20Digital.pdf> Acesso em: 08 de Novembro de 2023.

Amorim NM, Junior LCSP, Sanchez EF, de Aquino GA, Ferreira V, Ferreira SB, Fuly AL, de Oliveira EC. Synthesis, characterization and utilization of a new series of 1,2,3-triazole derivatives to neutralize some toxic activities of *Bothrops jararaca* snake venom. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002, 58.

Ayres JG, Warrell DA. 'Injuries, envenoming, poisoning, and allergic reactions caused by animals', in John Firth, Christopher Conlon, and Timothy Cox (eds). *Oxford Textbook of Medicine*. 2020; Pages 1778–C10.4.2.P266.

Bagcchi S. Experts call for snakebite to be re-established as a neglected tropical disease. *BMJ*. 2015; 351:h5313.

Barraviera, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. Revisão. *Jornal Brasileiro de Medicina* 65:209-250, 1993.

Bozorov K, Zhao J, Aisa HA. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2019; 15;27(16):3511-3531.

BRASIL. Nova abordagem ao tratamento em situação de escassez de antiveneno. Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. 2016. p. 1–6.

Butler MS, Buss AD. Natural products--the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*. 2006; 71(7):919-29.

Calvete JJ. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Review of Proteomics*. 2011; 8(6):739-58.

Calvete JJ. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. *Toxicon*. 2013; 75:44-62.

Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Letters*. 2009; 583(11):1736-43.

Campos VR, Abreu PA, Castro HC, Rodrigues CR, Jordão AK, Ferreira VF, De Souza M, Santos FC, Moura LA, Domingos TS, Carvalho C, Sanchez EF, Fuly AL, Cunha AC. Synthesis, biological, and theoretical evaluations of new 1,2,3-triazoles against the hemolytic profile of the *Lachesis muta* snake venom. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009; 17(21):7429-7434.

Caro D, Ocampo Y, Castro J, Barrios L, Salas R, Franco LA. Protective effect of *Dracontium dubium* against *Bothrops asper* venom. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 89:1105-1114.

Castañeda ICH, Pereañez JÁ, Preciado LM. Synthetic Inhibitors of Snake Venom Enzymes: Thioesters Derived from 2-Sulfenyl Ethylacetate. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019; 12(2):80.

Castro O, Gutiérrez JM, Barrios M, Castro J, Romero M, Umaña E. Neutralization of the hemorrhagic effect induced by *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) venom with tropical plant extracts. *Revista Biología Tropical*. 1999; 47(3):605-16.

Chanda A, Kalita B, Patra A, Senevirathne WDST, Mukherjee AK. Proteomic analysis and antivenomics study of Western India *Naja naja* venom: correlation between venom composition and clinical manifestations of cobra bite in this region. *Expert Review of Proteomics*. 2019; 16(2):171-184.

Charvat RA, Strobel RM, Pasternak MA, Klass SM, Rheubert JL. Analysis of snake venom composition and antimicrobial activity. *Toxicon*. 2018; 150:151-167.

Chazin EL, Martins LB, Vasconcelos TRA, Silva ACR, Branco MC, Fuly AL, Souza MVN, Gomes CRB, Sanchez EF. Synthesis and biological evaluation of novel 1,3-benzoxathiol-2-one sulfonamides against toxic activities of the venom of *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snakes. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Online)*. 2022; 33(1), 2-12.

Cheng F, Li W, Zhou Y, Shen J, Wu Z, Liu G, Lee PW, Tang Y. admetSAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012; 52(11):3099-3105.

Chippaux J-P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 2017; 23:38.

Da Silva ACR, Duarte MER, Nosedá MD, Ferreira LG, Cassolato JEF, Sanchez EF, Fuly AL. Potential Utilization of a Polysaccharide from the Marine Algae *Gayralia oxysperma*, as an Antivenom for Viperidae Snakebites. *Marine Drugs*. 2018; 16(11):412.

Da Silva ACR, Ferreira LG, Duarte ME, Fujii MT, Sanchez EF, Nosedá MD, Fuly AL. Protective Effect of the Sulfated Agarose Isolated from the Red Seaweed *Laurencia aldingensis* Against Toxic Effects of the Venom of the Snake, *Lachesis muta*. *Marine Biotechnology (NY)*. 2016; 18(6):619-629.

Da Silva AR, Anholeti MC, Pietroluongo M, Sanchez EF, Valverde AL, De Paiva SR, Figueiredo MR, Kaplan MAC, Fuly AL. Utilization of the Plant *Clusia Fluminensis* Planch

& Triana Against Some Toxic Activities of the Venom of *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* Snake Venom Toxic Activities. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2019; 19(22):1990-2002.

Da Silva AR, da Silva ACR, Donza MRH, Aquino GAS, Kaiser CR, Sanchez EF, Ferreira SP, Fuly AL. Design, synthesis and effect of triazole derivatives against some toxic activities of *Bothrops jararaca* venom. *Medicinal Chemistry Research*. 2020; 30: 182-195.

Da Silva ACR, Pires AMG, Ramos CJB. The seaweed *Prasiola crispa* (Chlorophyta) neutralizes toxic effects of *Bothrops jararacussu* snake venom. *Journal of Applied Phycology*. 2017; 29, 781–788.

Da Silva NM, Arruda EZ, Murakami YL, Moraes RA, El-Kik CZ, Tomaz MA, Fernandes FF, Oliveira CZ, Soares AM, Giglio JR, Melo PA. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. *Toxicon*. 2007; 50(2):196-205.

De Albuquerque UP, Muniz de Medeiros P, de Almeida AL, Monteiro JM, Machado de Freitas Lins Neto E, Gomes de Melo J, dos Santos JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 114(3):325-54.

De Alvarenga ES, Silva AS, Barosa LC, Demuner AJ, Parreira AG, Ribeiro RIMA, Marcussi S, Ferreira JMS, Resende RR, Granjeiro PA, Silva JÁ, Soares AM, Marangoni S, Da Silva SL. Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*. 2011; 57(1):100-108.

de Araújo, CRF; Silva, AB; Tavares, EC; da Costa, EP; Mariz, SR. Perfil e prevalência de uso de plantas medicinais em uma unidade básica de saúde da família em Campina Grande, Paraíba, Brasil. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, 2014;35(2):233-238.

De Moura VM, Freitas de Sousa LA, Cristina Dos-Santos M, Almeida Raposo JD, Evangelista Lima A, de Oliveira RB, da Silva MN, Veras Mourão RH. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: an assessment of their effectiveness in

inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 161:224-32.

De Moura VM, Guimarães NC, Batista LT, Freitas-de-Sousa LA, Martins JS, de Souza MCS, de Almeida PDO, Monteiro WM, de Oliveira RB, Dos- Santos MC, Mourão RHV. Assessment of the anti-snakebite properties of extracts of *Aniba fragrans* Ducke (Lauraceae) used in folk medicine as complementary treatment in cases of envenomation by *Bothrops atrox*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018; 213:350-358.

De Souza JF, Santana MVDS, da Silva ACR, Donza MRH, Ferreira VF, Ferreira SB, Sanchez EF, Castro HC, Fuly AL. Study on the synthesis and structure-activity relationship of 1,2,3-triazoles against toxic activities of *Bothrops jararaca* venom. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*. 2022; 77(11-12):459-471.

Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012; 2(2):303-36.

Domingos TF, Moura LA, Carvalho C, Campos VR, Jordão AK, Cunha AC, Ferreira VF, de Souza MCBV, Sanchez EF, Fuly AL. Antivenom effects of 1,2,3-triazoles against *Bothrops jararaca* and *Lachesis muta* snakes. *BioMed Research International*. 2013; 2013:294289.

Dressler S. Marcgraviaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB103323>. Acesso em: 02 de junho de 2022.

Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*. 2016; 112:4-29.

Eicher T, Hauptmann S, Speicher A. The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions Synthesis and Applications. 2003; 2nd Edition, Wiley-VCH, Weinheim.

Ferreira MLG, Pinheiro LCS, Santos Filho OA, Peçanha MDS, Sacramento CQ, Machado V, Ferreira VF, Souza TML, Boechat N. Design, synthesis, and antiviral activity of new 1H-1,2,3-triazole nucleoside ribavirin analogs. *Medicinal Chemistry Research*. 2014; 23, p.1501–1511.

Fialho LG, da Silva VP, Reis SRNI, Azeredo EL, Kaplan MAC, Figueiredo MR, Kubelka CF. Antiviral and Immunomodulatory Effects of *Norantea brasiliensis* Choisy on DengueVirus-2. *Intervirology*. 2016; 59:217–227.

Freitas de Sousa LA, Amazonas DR, Sousa LF, Sant'Anna SS, Nishiyama Jr MY, Serrano SM, Junqueira-de-Azevedo IL, Chalkidis HM, Moura-da-Silva AM, Mourão RH. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. *Biochimie*. 2015; 118:60-70.

Fry BG. From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Research*. 2005; 15(3):403-20.

Fuly AL, Machado OL, Alves EW, Carlini CR. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Thrombosis and Haemostasis*. 1997; 1372-1380.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde do Brasil. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: FUNASA. 2001; 2ª edição, 9-36 p.

FUNED. Fundação Ezequiel Dias. Animais peçonhentos. Belo Horizonte. 2014; 5ª edição. 5-16 p.

Furtado MFD, Cardoso ST, Soares OE, Pereira AP, Fernandes DS, Tambourgi DV, et al. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the Amazon region. *Toxicon*. 2010; 55: 881–887.

Garcia ES, Guimarães JA, Prado JL. Purification and characterization of a sulfhydryl-dependent protease from *Rhodnius prolixus* midgut. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1978; 315-322.

Giovannini P, Howes MR. Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*. 2017; 199:240-256.

Giraldo-Cañas D. Las especies del género *Schwartzia* (complejo norantea, marcgraviaceae) en Brasil. *Darwiniana, Nueva Serie*. 2004; 42(1-4), 169–175

Gutiérrez JM. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones em América Latina. *Revista de Biología Tropical*. 2002; 50(2). 377-394.

Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017; 3:17063.

Gutiérrez JM, León G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 1998; 36(11):1529-38.

Gutiérrez JM, León G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals*. 2011; 39(3):129-42.

Gutierrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Memórias do Instituto Butantan*. 1989; 51(4): 211–223.

Gutiérrez JM, Theakston RDG, Warrell DA. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. *PLoS Medicine*. 2006; 3(6):e150.

Harrison RA, Cook DA, Renjifo C, Casewell NR, Currier RB, Wagstaff SC. Research strategies to improve snakebite treatment: challenges and progress. *J Proteomics*. 2011; 74(9):1768-80.

Harrison RA, Gutiérrez JM. Priority Actions and Progress to Substantially and Sustainably Reduce the Mortality, Morbidity and Socioeconomic Burden of Tropical Snakebite. *Toxins (Basel)*. 2016; 8(12):351.

Jones NP, Arnason JT, Abou-Zaid M, Akpagana K, Sanchez-Vindas P, Smith ML. Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by First Nations Peoples of eastern Canada. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 73(1-2):191-8.

Jorge MT, Ribeiro LA. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1990; 36: 66-77.

Keri RS, Patil AS, Budagumpi S, Nagaraja BM. Triazole: A Promising Antitubercular Agent. *Chemical Biology & Drug Design*. 2015; 86(4):410-423.

Kharb R, Sharma PC, Yar MS. Pharmacological significance of triazole scaffold. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2011; 26(1):1-21.

Kondo H, Kondo S, Ikezawa H, Murata R, Ohsaka A. Studies on the quantitative methods for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. 1960; 43-51.

Laamari Y, Oubella A, Bimoussa A, El Mansouri AE, Ketatni EM, Mentre O, Ait Itto MY, Morjani H, Khouili M, Auhmani A. Design, Hemisynthesis, crystal structure and anticancer activity of 1, 2, 3-triazoles derivatives of totarol. *Bioorganic Chemistry*. 2021; 14(115):105165.

Lago JH, Chaves MH, Ayres MC, Agripino DG, Young MC. Evaluation of antifungal and DNA-damaging activities of alkaloids from branches of *Porcelia macrocarpa*. *Planta Medica*. 2007; 73(3):292-5.

Laloo DG, Theakston RD. Snake antivenoms. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*. 2003; 41(3):277-90; 317-27.

Lass-Flörl C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs*. 2011; 71(18):2405-2419.

Maia VC, Silva LO. Insect galls of Restinga de Marambaia (Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ). *Brazilian Journal of Biology*. 2016; 19;76(3):787-95.

Malange KF, dos Santos GG, Kato NN, Toffoli-Kadri MC, Carollo CA, Silva DB, Portugal LC, Alves FM, Santa Rita PH, Parada CA, Rondon ES. *Tabebuia aurea* decreases hyperalgesia and neuronal injury induced by snake venom. *Journal of Ethnopharmacology*. 2019; 6;233:131-140.

Melgarejo-Giménez AR. Criação e Manejo de Serpentes. Animais de laboratório criação e experimentação. 20ª edição. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. Scielo books, 2002. 175 p.

Melo JOF, Donnici CL, Augusti R, Ferreira VF, de Souza MCBV, Ferreira MLG, Cunha AC. 1,2,3-triazolic heterocycles: history, preparations, applications and pharmacological activities. *Química nova*. 2006; 29 (3).

Ministério da saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: FUNASA. 1998; 1ª edição, 9-37 p. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_diagnostico\\_tratamento\\_acidentes\\_animais\\_peconhentos.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_tratamento_acidentes_animais_peconhentos.pdf) Acesso em: 02 de junho de 2022.

Ministério da saúde. Guia de vigilância em saúde. Volume único. Brasília. 2019; 3ª edição, 652-655 p.

Mitchell W. Natural products from synthetic biology. *Current Opinion Chemical Biology*. 2011; 15(4):505-15.

Mors WB, Nascimento MC, Pereira BM, Pereira NA. Plant natural products active against snakebite: the molecular approach. *Phytochemistry*. 2000; 55, 627–642.

Moura LA, De Almeida AC, Da Silva AV, Souza VR, Ferreira VF, Menezes MV, Kaiser CR, Ferreira SB, Fuly AL. Synthesis, Anticlotting and Antiplatelet Effects of 1,2,3-Triazoles Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016; 12(8):733-741.

Nogueira CC, Argôlo AJS, Arzamendia V, Azevedo JA, Barbo FE, Bérnils RS., et al. Atlas of Brazilian snakes: verified point-locality maps to mitigate the wallacean shortfall in a megadiverse snake fauna. *South American Journal of Herpetology*. 2019; 14(sp1):1-274.

Ojeda PG, Ramírez D, Alzate-Morales J, Caballero J, Kaas Q, González W. Computational Studies of Snake Venom Toxins. *Toxins (Basel)*. 2017; 10(1):8.

Oliveira AL, Viegas MF, da Silva SL, Soares AM, Ramos MJ, Fernandes PA. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nature Reviews Chemistry*. 2022; 6(7):451-469.

Oliveira CF, Lopes DS, Mendes MM, Homsí-Brandeburgo MI, Hamaguchi A, Alcântara TM, Clissa PB, Rodrigues VM. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. *Toxicon*. 2009; 53(5):560-9.

Pedroso RS, Andrade G, Pires RH. Plantas medicinais: Uma abordagem sobre o uso seguro e racional. *Physis*. 2021; 31 (02).

Peyton LR, Gallagher S, Hashemzadeh M. Triazole antifungals: a review. *Drugs of Today (Barc)*. 2015; 51(12):705-18.

Pinho FMO, Pereira ID. Ofidismo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2001; 47(1): 24-9.

Pithayanukul P, Ruenraroengsak P, Bavovada R, Pakmanee N, Suttisri R, Saenoon S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 97(3):527-33.

Pucca MB, Cerni FA, Janke R, Bermúdez-Méndez E, Ledsgaard L, Barbosa JE, Laustsen AH. History of Envenoming Therapy and Current Perspectives. *Frontiers Immunology*. 2019;10:1598.

Reis FP, Senna Bonfa IM, Cavalcante RB, Okoba D, de Souza Vasconcelos SB, Candeloro L, de Oliveira Filiu WF, Duenhas Monreal AC, da Silva VJ, Santa Rita PH, Carollo CA, Toffoli-Kadri MC. *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*. *Journal of Ethnopharmacol*. 2014; 158 Pt A:352-7.

Rocha MEN. Potencialidades biodinâmicas de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). 2002. Tese Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Romano-Hoge, SARWL. Principais Serpentes de Interesse Médico. Reconhecimento. Distribuição Geográfica no Continente Americano. In: Soerensen B (ed) *Animais Peçonhentos*, Atheneu, Rio de Janeiro, p. 1-46, 1990.

Russell P. A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Science*. 2005; 143(1), 11-25.

Saavedra SL, Avila L, Giudicessi SL, Albericio F, Camperi AS, Cascone O, Martinez-Ceron MC. Natural Snake Venom Inhibitors and their Pharmaceutical Uses: Challenges and Possibilities. *Current Pharmaceutical Design*. 2018; 24(16):1737-1747.

Sales MDC, Costa HB, Fernandes PMB, Ventura JA, Meira DD. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016; p.26-31.

Sant'Ana Malaque CM, Gutiérrez JM. Snakebite Envenomation in Central and South America. In: Brent, J., Burkhart, K., Dargan, P., Hatten, B., Megarbane, B., Palmer, R. (eds). *Critical Care Toxicology*. 2015; pp 1–22.

Scheske L, Ruitenbergh J, Bissumbhar B. Needs and availability of snake antivenoms: relevance and application of international guidelines. *International Journal of Health Policy and Management*. 2015; 4(7): 447–457.

Secretaria da Saúde. Guia de suporte para diagnóstico e tratamento de vítimas de acidentes por animais peçonhentos. Governo do estado do Ceará. 2021; 1ª edição, 5-44.

Senise LV, Yamashita KM, Santoro ML. Bothrops jararaca envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. *Experimental Biology and Medicine*. 2015; 240(11):1528-1536.

Senji Laxme RR, Khochare S, de Souza HF, Ahuja B, Suranse V, Martin G, Whitaker R, Sunagar K. Beyond the 'big four': Venom profiling of the medically important yet neglected Indian snakes reveals disturbing antivenom deficiencies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019; 13(12):e0007899.

Shadyro OI, Timoshchuk VA, Polozov GI, Povalishev VN, Andreeva OT, Zhelobkovich VE. Synthesis and antiviral activity of spatially-screened phenols: 1,3-Benzoxathiolan-2-one derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1999; 33:366–369.

Silva TPD, Moura VM, Souza MCS, Santos VNC, Silva KAMMD, Mendes MGG, Nunez CV, Almeida PDO, Lima ES, Mourão RHV, Dos- Santos MC. Connarus favosus Planch.: an inhibitor of the hemorrhagic activity of Bothrops atrox venom and a potential antioxidant and antibacterial agent. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016; 183:166-175.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2022. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def> Acesso em: 02 de junho de 2022.

Strauch MA, Tomaz MA, Monteiro-Machado M, Cons BL, Patrão-Neto FC, Teixeira- Cruz JDM, Tavares-Henriques MDS, Nogueira-Souza PD, Gomes SLS, Costa

PRR, Schaeffer E, Da Silva AJM, Melo PA. Lapachol and synthetic derivatives: in vitro and in vivo activities against Bothrops snake venoms. *PLoS One*. 2019; 14(1):e0211229.

Strauch MA, Tomaz MA, Monteiro-Machado M, Ricardo HD, Cons BL, Fernandes FF, El-Kik CZ, Azevedo MS, Melo PA. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 145(1):50-8.

Tasoulis T, Isbister GK. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins (Basel)*. 2017; 9(9):290.

Tasoulis T, Pukala TL, Isbister GK. Investigating Toxin Diversity and Abundance in Snake Venom Proteomes. *Frontiers Pharmacology*. 2022; 14;12:768015.

Teixeira VL. Produtos Naturais Marinhos. Em: Pereira RC, Soares-Gomes A. *Biologia Marinha*. 2ªed. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2009; 443-72.

Terra L, de L Chazin E, de S Sanches P, Saito M, de Souza MVN, Gomes CRB, Wardell JL, Wardell SMSV, Sathler PC, Silva GCC, Lione VO, Kalil M, Joffily A, Castro HC, Vasconcelos TRA. Evaluation of 1,3-benzoxathiol-2-one Derivatives as Potential Antifungal Agents. *Medicinal Chemistry*. 2018; 14(3):304-310.

The Lancet. Latest global disease estimates reveal perfect storm of rising chronic diseases and public health failures fuelling COVID-19 pandemic. 2020. Disponível em: <https://www.healthdata.org/news-events/newsroom/news-releases/lancet-latest-global-disease-estimates-reveal-perfect-storm> Acesso em: 13 de Novembro de 2023.

The Lancet. Snakebite-emerging from the shadows of neglect. *Lancet*. 2019; 393(10187):2175.

Vaiyapuri S, Vaiyapuri R, Ashokan R, Ramasamy K, Nattamaisundar K, Jeyaraj A, Hutchinson EG. Snakebite and Its Socio-Economic Impact on the Rural Population of Tamil Nadu, India. *PLoS ONE*. 2013; 8(11):e80090.

Vásquez J, Alarcón JC, Jimenes SL, Jaramilli GI, Gomes-Betancur IC, Rey- Suarez JP, Jaramillo KM, Munoz DC, Marin DM, Romero JO. Main plants used in traditional medicine for the treatment of snake bites in the regions of the department of Antioquia, Colombia. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 170:158-66.

Vishwanath BS, Kini RM, Gowda TV. Characterization of three edema inducing phospholipase A2 enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with alkaloid aristolochic acid. *Toxicon*. 1987; 501-515.

Vongphoumy I, Phongmany P, Sydala S, Prasith N, Reintjes R, Blessmann J. Snakebites in Two Rural Districts in Lao PDR: Community-Based Surveys Disclose High Incidence of an Invisible Public Health Problem. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015; 9(6):e0003887.

Vonk FJ, Casewell NR, Henkel CV, Heimberg AM, Jansen HJ, McCleary RJ, Kerckamp HM, Vos RA, Guerreiro I, Calvete JJ, Wüster W, Woods AE, Logan JM, Harrison RA, Castoe TA, de Koning AP, Pollock DD, Yandell M, Calderon D, Renjifo C, Currier RB, Salgado D, Pla D, Sanz L, Hyder AS, Ribeiro JM, Arntzen JW, van den Thillart GE, Boetzer M, Pirovano W, Dirks RP, Spaik HP, Duboule D, McGlinn E, Kini RM, Richardson MK. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110(51):20651-6.

Yamaguti-Sasaki E, Ito LA, Canteli VC, Ushirobira TM, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV, de Mello JC. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules*. 2007; 12(8):1950-63.

Yang H, Lou C, Sun L, Li J, Cai Y, Wang Z, Li W, Liu G, Tang Y. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*. 2018; 35(6):1067-1069.

Warrell DA. Snake bite. *Lancet*. 2010; 375(9708):77-88.

Warrell DA. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell, J.A.; Lamar, W.W. (Eds). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere vol. 2. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London*. 2004; p. 709-761.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. 2013. Disponível em:

<https://www.who.int/publications/m/item/snake-antivenom-immunoglobulins-annex-5-trs-no-1004> Acesso em: 28 de Outubro de 2023.

WHO. World Health Organization. Report of the Tenth Meeting of the WHO Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases. Geneva. 2017.

WHO. World Health Organization. Snakebite envenoming, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming> Acesso em: 02 de Junho de 2022.

Zeni ALB, Mattos APG, Helena ETS. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. *Ciência. Saúde Colet.* 2017; 22 (8).

Zhou CH, Wang Y. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Current Medicinal Chemistry.* 2012; 19(2):239-80.