

Potencial antiofídico do “Jatobá” *Hymenaea rubriflora* (Ducke, 1953) frente às peçonhas de *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824) e *Bothrops Leucurus* (Wagler, 1824)

Antiophidian Potential of “Jatobá” *Hymenaea rubriflora* (Ducke, 1953) Against *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824) and *Bothrops leucurus* (Wagler, 1824) Venoms

Alexandra Mendes Santana Lima¹, Rianne Ferreira Felix², Felipe Santana de Souza², Márcia Vanusa da Silva², Francisco Canindé de Sousa Junior³, Bruno Oliveira de Veras²

¹ Universidade de Pernambuco (UPE) – Recife, PE, Brasil; ² Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Recife, PR, Brasil; ³ Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Natal, RN, Brasil.

Lima, A. M. S.
alexandramslima@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0004-1890-1752>

Felix, R. F.
rienne.ferreira@ufpe.br
<https://orcid.org/0000-0002-5159-6831>

Souza, F. S. de
felipe.ssouza@ufpe.br
<https://orcid.org/0000-0003-4894-1259>

Silva, M. V. da
marcia.vanusa@ufpe.br
<https://orcid.org/0000-0002-2221-5059>

Sousa Jr., F. C. de
fcfarma@yahoo.com.br
<https://orcid.org/0000-0003-2042-4348>

Veras, B. O. de *
bruno.veras@ufpe.br
<https://orcid.org/0000-0002-7814-1757>

*Autor correspondente: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

Resumo: O gênero *Bothrops* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Brasil. A fisiopatologia dos envenenamentos pode causar lesões locais e sistêmicas, podendo levar ao óbito. Plantas medicinais são frequentemente mencionadas na medicina popular como terapias alternativas frente aos efeitos do envenenamento na ausência do soro antiofídico. A família Fabaceae é descrita na literatura por suas propriedades antiofídicas, associadas principalmente à diversidade de moléculas bioativas. *Hymenaea* spp. é conhecido por conter moléculas com atividades biológicas significativas, como antioxidante e anti-inflamatória, que podem atuar contra as toxinas Botrópicas. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a composição fitoquímica, as atividades antioxidante e citotóxica, bem como a neutralização enzimática dos venenos de *B. jararaca* e *B. leucurus* pelo extrato hidroalcoólico das folhas do “Jatobá” (*Hymenaea rubriflora*). O extrato foi obtido através da maceração com etanol 70% na proporção de 1:10 (m:v). Em seguida, foi realizado o perfil fitoquímico, avaliação da ação citotóxica e potencial antioxidante. Também foi analisada *in vitro* a inibição das atividades proteolítica, fibrinogenolítica, fibrinolítica e a degradação de DNA causadas pelas toxinas das peçonhas ofídicas. No perfil fitoquímico de *Hymenaea rubriflora*, identificou-se a presença de ácido gálico. O extrato não apresentou citotoxicidade, tendo alta capacidade antioxidante em todos os métodos testados. O extrato inibiu mais de 60% da atividade proteolítica na proporção de 1:10 veneno (m:m) para ambos as peçonhas, além de inibir a degradação das cadeias α e β do fibrinogênio, a degradação do DNA λ e 100% da ação fibrinolítica. Conclui-se que o extrato hidroalcoólico do “Jatobá” (*Hymenaea rubriflora*) apresenta potencial atividade antiofídica contra os venenos de *B. jararaca* e *B. leucurus*, demonstrando que esta espécie vegetal pode ser utilizada em pesquisas *in vivo* mais aprofundadas no futuro.

Palavras-chave: Fabaceae, Jatobá, Serpentes, Atividade antiofídica, Venenos ofídicos.

Abstract: The *Bothrops* genus is responsible for most snakebite accidents in Brazil. The pathophysiology of envenomation can cause local and systemic lesions, potentially leading to death. Medicinal plants are frequently mentioned in popular medicine as alternative therapies against the effects of envenomation in the absence of antivenom. The Fabaceae family is described in the literature for its antivenom properties, mainly associated with the diversity of bioactive molecules. *Hymenaea* spp. is known to contain molecules with significant biological activities, such as antioxidant and anti-inflammatory, which can act against *Bothrops* toxins. Therefore, the present study aimed to evaluate the phytochemical composition, antioxidant and cytotoxic activities, as well as the enzymatic neutralization of the venoms of *B. jararaca* and *B. leucurus* by the hydroalcoholic extract of the leaves of “Jatobá” (*Hymenaea rubriflora*). The extract was obtained through maceration with 70% ethanol in the proportion of 1:10 (w:v). Subsequently, the phytochemical profile, cytotoxic activity, and antioxidant potential were evaluated. The inhibition of proteolytic, fibrinogenolytic, fibrinolytic activities, and DNA degradation caused by the snake venoms toxins were also analyzed *in vitro*. In the phytochemical profile of *Hymenaea rubriflora*, the presence of gallic acid was identified. The extract showed no cytotoxicity and had high antioxidant capacity in all tested methods. The extract inhibited more than 60% of the proteolytic activity at a 1:10 venom ratio (w:w) for both venoms, in addition to inhibiting the degradation of the α and β chains of fibrinogen, λ DNA degradation, and 100% of fibrinolytic activity. It is concluded that the hydroalcoholic extract of “Jatobá” (*Hymenaea rubriflora*) has potential antivenom activity against the venoms of *B. jararaca* and *B. leucurus*, demonstrating that this plant species can be used in more in-depth *in vivo* studies in the future.

Keywords: Fabaceae, Jatobá, Snakes, Antiofídica activity, Snake venoms.

INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam uma das principais causas de mortalidade associadas às Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), conforme reportado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), com elevada incidência observada em nações de clima tropical e subtropical (World Health Organization [WHO], 2007). No Brasil, o ofidismo figura entre as principais doenças negligenciadas relacionadas a animais peçonhentos, registrando anualmente mais de 20.000 casos notificados (Brasil, 2024; Da Silva et al., 2023). O gênero *Bothrops*, que compreende aproximadamente 30 das 48 espécies conhecidas no país (Matos & Ignotti, 2020), constitui a principal categoria taxonômica de serpentes peçonhentas responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824) e *Bothrops leucurus* (Wagler, 1824), com comprimentos típicos de cerca de 1,60 m e 1,50 m, respectivamente, são espécies endêmicas das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, destacando-se como principais agentes etiológicos de envenenamento ofídico nessas áreas (Bernarde, 2014).

O envenenamento ofídico do tipo Botrópico é caracterizado principalmente por efeitos locais intensos e imediatos, como edemas, hemorragias e necrose, além de alterações cardiovasculares como sangramento sistêmico, choque hipovolêmico e distúrbios de coagulação (Albuquerque et al., 2013; Félix-Silva et al., 2017; Gutiérrez & Lomonte, 2013). Essas fisiopatologias estão intrinsecamente ligadas às principais ações dos venenos botrópicos (Bv): 1) Indução de hemorragias e distúrbios na coagulação por meio de enzimas como metaloproteinases e fosfolipases, que interferem na coagulação sanguínea e promovem a degradação da matriz extracelular; 2) Promoção de necrose tecidual local através de fosfolipases e proteases que atacam membranas celulares e proteínas estruturais, resultando em necrose, ulcerações e gangrena; 3) Produção de efeitos sistêmicos adversos mediante a liberação de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores que desencadeiam resposta inflamatória generalizada, podendo ocasionar complicações como choque, insuficiência renal e disfunções orgânicas múltiplas. Adicionalmente, as toxinas podem

ocasionar a destruição celular e a liberação de produtos tóxicos na circulação (Carone et al., 2018; Cruz et al., 2009).

Atualmente, o tratamento específico para o envenenamento Botrópico é realizado por meio da administração intravenosa de Soro Antiveneno Botrópico (BAv) (Lucas, 2009). Embora eficaz na reversão dos efeitos sistêmicos do veneno, o soro demonstra limitações na neutralização dos efeitos locais e pode não oferecer proteção completa contra as atividades tóxicas induzidas pelos diferentes venenos das espécies de *Bothrops* spp., essa necessidade sugere a inclusão de outros componentes no pool de imunização para desenvolver um BAv universal (Jorge et al., 1995; Muniz et al., 2000; Queiroz et al., 2008). Adicionalmente, o alto custo de produção do soro restringe sua distribuição a áreas específicas. A diversidade de habitats, a extensa área territorial e as disparidades socioeconômicas (Gutiérrez et al., 2017; Longbottom et al., 2018) aumentam a probabilidade de acidentes, exacerbando a gravidade dos incidentes em regiões onde o soro não está disponível (Feitosa et al., 2015). Portanto, as principais vítimas de acidentes ofídicos, como crianças e agricultores idosos em áreas remotas, frequentemente recorrem a terapias alternativas para mitigar os efeitos fisiopatológicos do envenenamento, como o uso de plantas medicinais locais (Borges & Amorim, 2020), que podem oferecer algum alívio quando o tratamento padrão (antiveneno) não está acessível (De Moura et al., 2018).

A família Fabaceae é reconhecida por abrigar várias espécies com potencial antiofídico, capazes de neutralizar os efeitos do veneno de serpentes. Esse potencial é amplamente atribuído à presença de uma diversidade de biomoléculas nas plantas do grupo, como fenóis, terpenos, esteroides e cumarinas (Omara, 2020). Essas propriedades antiofídicas são frequentemente associadas à capacidade dessas plantas de interferir com enzimas presentes nos venenos ofídicos, como proteases e fosfolipases, além de modular a resposta inflamatória e reduzir o estresse oxidativo associado ao envenenamento (Adrião et al., 2022). A pesquisa continua para aprofundar o entendimento e explorar o potencial dessas plantas no desenvolvimento de novos tratamentos e terapias para acidentes ofídicos (Konrath et al., 2022; Upasani et al., 2017). O gênero *Hymenaea*, conhecido popularmente como "Jatobá", está amplamente distribuído

em países de clima tropical, incluindo o Brasil (Boniface et al., 2017). As espécies desse gênero têm sido historicamente utilizadas para tratar diversas condições inflamatórias, como hemorragias, infecções, cicatrização de feridas e artrite (Pacheco et al., 2022; Vale et al., 2013). Além das propriedades antioxidantes já conhecidas, estudos anteriores confirmaram a atividade inibitória da acetilcolinesterase no extrato das folhas de *Hymenaea rubriflora* Ducke (Miranda et al., 2020).

Neste contexto, o objetivo foi investigar a composição fitoquímica, as atividades antioxidante e citotóxica, além de avaliar a atividade antiofídica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Hymenaea rubriflora* ("Jatobá") (EHHr) através da neutralização das atividades proteolítica, fibrinogenolítica, fibrinolítica e DNase dos venenos de *B. jararaca* e *B. leucurus*.

METODOLOGIA

Coleta do material vegetal e obtenção do extrato

As folhas de *Hymenaea rubriflora* (Ducke, 1953) foram coletadas no fragmento de Mata Atlântica do Engenho Piedade, na região interiorana de Igarassu, Costa Norte de Pernambuco, Brasil, nas coordenadas 7° 50' 03" S e 34° 54' 23" W, em setembro de 2018. O material foi identificado botanicamente e uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) com o número IPA78292. A coleta do material vegetal foi autorizada e registrada pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (Processo n.º: A08E18B). Após a coleta, as folhas foram secas por 5 dias em estufa com circulação de ar forçado a 45 °C e posteriormente trituradas em moinho de facas. O extrato foi obtido por maceração em álcool 70% na proporção de 1:10 (m/v). O processo foi repetido duas vezes, cada uma com duração de 12 horas. Após cada extração, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo a pressão reduzida, mantendo temperaturas entre 65–70 °C para remoção do solvente. O material seco foi armazenado em dessecador até as análises serem realizadas.

Veneno ofídico

O veneno liofilizado de espécimes adultos de *Bothrops leucurus* (Wagler, 1824) (Squamata: Viperidae) (BIV) foi gentilmente cedido pelo Instituto Butantan (IB, São Paulo–SP, Brasil). O veneno liofilizado de espécimes adultos de *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824) (Squamata: Viperidae) (BJV) foi adquirido no Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA, Morungaba–SP, Brasil). A utilização do material foi autorizada e registrada pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (Processo n.º A4E54A3).

Cromatografia em camada delgada (CCD)

A presença de metabólitos secundários como alcaloides, compostos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas, terpenoides/esteroides, saponinas e quinonas foi investigada por análise em cromatografia em camada delgada (CCD) usando sílica gel 60 GF₂₅₄ (Sigma-Aldrich®) (Wagner & Bladt, 1996).

Perfil fenólico do extrato

Os compostos fenólicos presentes no extrato foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) da Thermo Scientific (Waltham, EUA) equipada com bomba quaternária, amostrador automático e detector de arranjo de diodos (DAD). Padrões de referência de compostos fenólicos (eugenol, vanilina, quercetina, ácido elágico, catequina e ácido gálico), juntamente com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Hymenaea rubriflora* ("Jatobá") (EHHr), foram filtrados através de membrana de náilon orgânico (0,22 µm) antes da injeção. A separação foi conduzida em uma coluna Shim-pack CLC-ODS (M) C18 (250 × 4,6 mm; Shimadzu, Kyoto, Japão) mantida a 30 °C. A fase móvel consistiu em ácido acético a 1% (A) e acetonitrila (B). O eluente foi programado com um gradiente de 0-30% (B) por 0-10 min, 30-70% (B) por 10-15 min, 70-100% (B) por 15-20 min e 100% (B) por 20-25 min. A vazão foi ajustada para 1,0 mL/min e o volume de injeção foi de 10 µL. Os comprimentos

de onda de detecção foram otimizados para cada composto de referência. Os dados foram processados utilizando o software ChromQuest 5.0 (Thermo Scientific, Waltham, EUA). A quantificação dos compostos foi realizada com base no tempo de retenção e espectro de absorvância do extrato, medido com DAD, em comparação aos padrões de referência. Curvas de calibração externas foram construídas para cada padrão e os resultados foram expressos em miligramas de composto fenólico por grama de amostra (mg/g). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Atividade antioxidante in vitro do extrato

Eliminação do radical ABTS⁺

A atividade antioxidante pelo ensaio de ABTS⁺ (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) baseou-se na geração do radical cromóforo catiônico obtido a partir da oxidação de ABTS⁺ por persulfato de potássio (De Veras et al., 2020). As medições foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de ABTS⁺ removido. Ácido Gálico foi utilizado como padrão. O percentual de inibição (I%) foi calculado pela seguinte equação: $I\% = [(Ac - Aa) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorvância do controle e Aa é a absorvância da amostra. A concentração inibitória média (CI₅₀) da atividade de ABTS⁺ foi calculada com base na regressão linear da porcentagem de ABTS⁺ remanescente contra a concentração da amostra.

Eliminação do radical DPPH⁺

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres foi medida por meio da doação de hidrogênio utilizando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH⁺) (De Veras et al., 2020). As medições foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de DPPH⁺ removido. Foi utilizado Ácido Gálico como padrão. O percentual de inibição (I%) foi calculado pela seguinte equação: $I\% = [(Ac - Aa) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorvância do controle e Aa é a absorvância da amostra. A concentração inibitória média (CI₅₀) da atividade de DPPH⁺ foi calculada

com base na regressão linear da porcentagem de DPPH⁺ remanescente contra a concentração da amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Capacidade antioxidante total

A Capacidade Antioxidante Total foi determinada pelo método do fosfomolibdênio (Prazeres et al., 2019). O ensaio baseou-se na redução do Mo⁺⁶ a Mo⁺⁵ pela amostra e posterior formação de um complexo Fosfato/Molibdênio⁺⁵ esverdeado. Tubos contendo as amostras e reagentes (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM) foram incubados a 100 °C por 90 min. Posteriormente, as absorvâncias de cada solução foram medidas a 695 nm contra um branco, sem adição de amostra. O ácido ascórbico foi usado como referência. A capacidade antioxidante total (I%) foi calculada pela seguinte equação: $I\% = [(Ac - Aa) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorvância do controle e Aa é a absorvância da amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. A concentração inibitória média (CI₅₀) de CAT foi calculada com base na atividade de regressão do linear contra a concentração da amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Ensaio de toxicidade in vitro

A linhagem celular não cancerígena L-929 (fibroblasto murino) foi utilizada, sendo cultivada em frascos de cultura contendo meio DMEM suplementado com 1% de antibióticos e 10% de soro fetal bovino (SFB), e incubada a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado até atingir 100% de confluência utilizando um microscópio invertido. As células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE, onde os experimentos foram conduzidos. A viabilidade das células L929 nos diferentes tratamentos foi comparada com o controle negativo usando a fórmula: viabilidade celular (%) = [(média da absorvância dos tratamentos / média do controle) x 100] (Wang et al., 2011). Adicionalmente, a concentração inibitória média (CI50) foi calculada por regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism® (versão 8.4.3; San Diego, Califórnia, EUA).

Avaliação da atividade antifúngica do extrato

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para investigar as possíveis interações entre as proteínas presentes nos venenos de *B. leucurus* (BIV) e *B. jararaca* (BjV) com o extrato hidroalcoólico das folhas do "Jatobá" *H. rubriflora* (EHHr), utilizou-se o método de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio a 12,5%), conforme descrito previamente (Laemmli, 1970). O ensaio foi conduzido para analisar a interação entre os venenos e diferentes proporções do extrato (1:0,01; 1:0,1; 1:1 e 1:10, em massa/massa de veneno). Os venenos foram diluídos para uma concentração de 3 mg/mL. Como controle, utilizou-se solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os géis (dimensões 10 cm x 12,5 cm, espessura de 1 mm) foram submetidos a uma corrente elétrica constante de 20 mA, utilizando um tampão de corrida contendo Tris 25 mM, glicina 0,192 mM e SDS 10%. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Brilliant Blue 0,1%; metanol 40%; ácido acético 10%) por 60 minutos, com agitação constante, e posteriormente descorados em solução descorante (metanol 30%; ácido acético 10%).

Inibição da atividade proteolítica sobre Azocaseína

A atividade proteolítica dos venenos foi determinada utilizando a azocaseína como substrato (Félix-Silva et al., 2017). Para o ensaio, 25 µL dos venenos (3 mg/mL) foram pré-incubados com diferentes proporções do extrato (1:0,01; 1:0,1; 1:1 e 1:10, em massa/massa de veneno) em um volume final de 100 µL, por 30 minutos a 37°C. A azocaseína em solução salina tamponada com fosfato (PBS) serviu como branco (0% atividade proteolítica), enquanto os venenos (3 mg/mL) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram utilizados como controle positivo (100% atividade proteolítica). Em cada tubo, 100 µL de azocaseína (10 mg/mL em 50 mM Tris-HCl pH 7,4 contendo 200 mM de NaCl e 5 mM de CaCl₂) foi adicionado e incubado por 60 minutos a 37°C. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético

a 5%, seguido de incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 15.000 r.p.m por 10 minutos a 22°C. O sobrenadante (100 µL) foi transferido para uma microplaca de 96 poços e misturado com volume igual de NaOH 0,5 M. A absorbância das amostras foi medida a 440 nm utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade proteolítica em relação ao controle positivo, apresentados como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Inibição da atividade fibrinogenolítica em SDS-PAGE

A identificação da atividade fibrinogenolítica dos venenos *B. jararaca* (BjV) e *B. leucurus* (BIV) foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE (12,5%), conforme descrito anteriormente na literatura (Laemmli, 1970). Para o ensaio, o BjV e BIV (3 mg/mL) foram pré-incubados por 30 minutos a 37 °C com o extrato em diferentes proporções de 1:0,01; 1:0,1; 1:1 e 1:10 (veneno, m/m). Em seguida, foram adicionados 60 µg de fibrinogênio bovino às amostras, que foram incubadas por 3 horas a 37 °C. Após a incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de tampão (1,5 M Tris-HCl, 10% v/v glicerol, 10% v/v β-mercaptoetanol, 2% p/v SDS e 0,05% p/v de azul de bromofenol, pH 8,8) e aquecimento das amostras a 100 °C por 5 minutos. Os venenos sem o extrato também foram analisados. O fibrinogênio puro foi utilizado como controle para visualizar o perfil de fibrinogênio intacto (ausência de atividade fibrinogenolítica). Os venenos com fibrinogênio foram usados como controle positivo (100% de atividade fibrinogenolítica). O marcador de peso molecular Amersham™ ECL™ Rainbow™ foi utilizado. Todos os produtos foram analisados em gel de SDS-PAGE 12,5%, com corrente constante de 20 mA por 2 horas. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Inibição da atividade fibrinolítica

A inibição da atividade fibrinolítica foi realizada em placas de Petri de poliestireno de 100x20 mm, contendo gel de

agarose (2%), fibrinogênio bovino (0,2%) e trombina bovina a 2U/mL em tampão Tris-HCl 50 mM (200 mM de NaCl, 50 mM de CaCl₂, pH 7,3). Para o ensaio, os venenos Blv ou Bjv (2,5 mg/mL) foram pré-incubados por 30 minutos a 37 °C com diferentes proporções do extrato (1:0,01; 1:0,1; 1:1 e 1:10, veneno, m/m). Alíquotas de 20 µL das amostras em triplicata foram aplicadas em poços de 2 mm nas placas e incubadas a 37 °C por 24 horas. Como controle negativo, foi utilizada solução salina tamponada com fosfato (PBS) (0% atividade fibrinolítica). Os venenos Blv ou Bjv (2,5 mg/mL) foram avaliados isoladamente como controle positivo (100% de atividade fibrinolítica). O diâmetro do halo de hidrólise foi medido subtraindo o diâmetro do poço do diâmetro total utilizando o software ImageJ. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) do diâmetro da área de lise (mm).

Identificação de degradação de DNA em gel de agarose

A inibição da atividade nuclease dos venenos foi investigada de acordo com uma metodologia modificada (Jose et al., 2011). Inicialmente, diversas concentrações de venenos foram adicionadas ao DNA λ (Thermo Fisher Scientific) para determinar as mínimas concentrações de venenos capazes de fragmentar o material genético. Para os ensaios de inibição, os venenos Blv ou Bjv (1 mg/mL) foram pré-incubados por 30 minutos a 37 °C com extrato hidroalcoólico das folhas da espécie "Jatobá" *Hymenaea rubriflora* (EHR) em diferentes proporções (1:0,01; 1:0,1; 1:1 e 1:10, m/m), resultando em um volume final de 20 µL. Um controle negativo contendo apenas DNA λ (amostra íntegra) foi incluído. O controle positivo de fragmentação (Blv ou Blv + DNA λ) também foi realizado. Após a pré-incubação, 20 µL de DNA λ (200 ng) em tampão de PCR 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,01% gelatina, pH 8,3) foram adicionados às amostras. A mistura foi incubada por 2 horas a 37°C. Em seguida, foi adicionado Gel Load Dye (6X) e SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (10.000X) às amostras, que foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) (Sigma-Aldrich, Haverhill, Reino Unido) em tampão TBE 0,5x por 2 horas a 80 V. Um marcador de peso Amresco® 100 a 3000bp foi utilizado. Os géis foram analisados em um transiluminador UV.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism® (versão 8.4.3; San Diego, California, EUA). A análise estatística consistiu em ANOVA unidirecional seguida por testes de Tukey-Kramer ou Bonferroni, conforme apropriado. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão, considerando um nível de significância de $p \leq 0,05$, salvo indicação específica em contrário.

RESULTADOS

Rendimento e perfil fitoquímico de EHR

O extrato hidroalcoólico das folhas secas de *Hymenaea rubriflora* apresentou um rendimento de 4%, resultando em aproximadamente 12 g de extrato seco obtido. A análise do perfil fitoquímico do extrato (EHR) revelou a presença de diversos metabólitos secundários, incluindo taninos, flavonoides, terpenos, esteroides, saponinas e quinonas. Por outro lado, não foram detectados alcaloides e cumarinas no extrato (Tabela 1).

Tabela 1

Constituintes fitoquímicos do extrato de hidroalcoólico das folhas do "jatobá" *H. rubriflora* (EHR).

Constituintes fitoquímicos	Deteção
Compostos Fenólicos	+
Taninos	+
Flavonoides	+
Alcaloides	-
Cumarinas	-
Terpenos e Esteroides	+
Saponinas	+
Quinonas	+

(+): Presença de composto químico. (-): Ausência de composto químico.

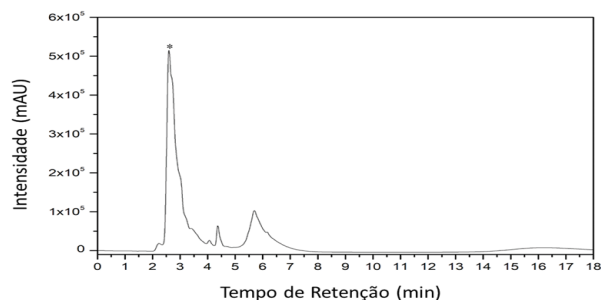
Perfil fenólico do extrato

O extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHR) foi submetido à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A análise revelou um pico intenso com tempo

de retenção de aproximadamente 3 minutos, correspondente ao padrão de Ácido Gálico (AG) (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), com uma concentração de ácido gálico de $82,97 \pm 6,20$ mg/g de extrato seco (Figura 1). Os demais picos detectados no cromatograma não apresentaram correspondência com os padrões utilizados na análise (eugenol, vanilina, quercetina, ácido elágico e catequina).

Figura 1

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato de hidroalcoólico das folhas do "Jatobá" *H. rubriflora* (EHR)



(*) pico do metabólito ácido gálico.

Atividade antioxidante *in vitro* do extrato

A capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHR) foi avaliada através da atividade de neutralização de DPPH⁺ e ABTS⁺, além da determinação da Capacidade Antioxidante Total (CAT), com os resultados expressos em valores de concentração inibitória média (CI₅₀) (De Veras et al., 2020; Prazeres et al., 2019). Conforme apresentado na Tabela 2, o EHR demonstrou uma atividade significativa na neutralização do radical DPPH⁺, com um valor de CI₅₀ de $150,89 \pm 6,14$ µg/mL. Para o radical ABTS⁺, o EHR mostrou um valor de CI₅₀ de $771,33 \pm 18,50$ µg/mL, utilizando ácido gálico como padrão de referência tanto para DPPH⁺ quanto para ABTS⁺. Em relação à Capacidade Antioxidante Total, o EHR exibiu um valor de CI₅₀ de $1.576,96 \pm 17,02$ µg/mL.

Tabela 2

Atividade antioxidante do extrato de hidroalcoólico das folhas do "jatobá" *H. rubriflora* (EHR)

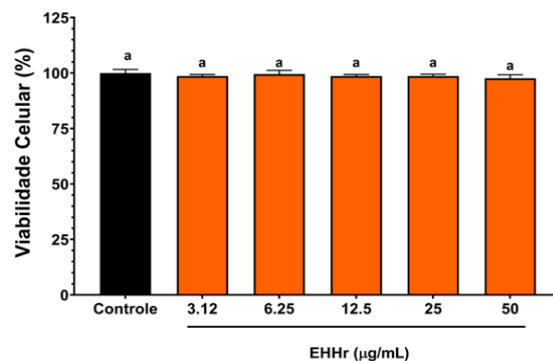
Amostras	CI ₅₀ (µg/mL)		
	DPPH ⁺	ABTS ⁺	CAT
EHR	150,89±6,14	771,33±18,50	1576,96±17,02
Ácido Gálico	8,61±0,27	155,80±16,88	N.T.
Ácido Ascórbico	N.A.	N.A.	500±10

Ensaio de toxicidade *in vitro* do extrato

A toxicidade *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHR) foi investigada utilizando células de fibroblastos murinos (L-929) (Figura 2). Não foi observada diferença estatística significativa na redução da viabilidade celular causada pelo EHR, indicando ausência de citotoxicidade em todas as concentrações testadas.

Figura 2

Avaliação da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico de *H. rubriflora* (EHR) pelo método do MTT em células de fibroblastos murinos (L-929). Os resultados foram expressos como a média da viabilidade celular obtida em dois experimentos independentes realizados em triplicata, com o respectivo desvio padrão. A letra minúscula "a" indica que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme determinado pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, com um nível de significância de $p < 0,05$.

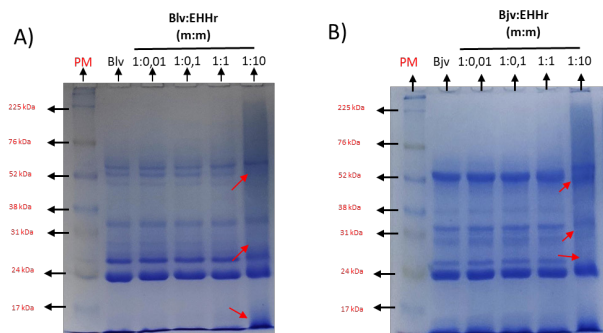


Eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE)

O perfil proteico das peçonhas de *Bothrops jararaca* (BjV) e *Bothrops leucurus* (BIV), na presença de diferentes proporções do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHR), foi analisado por eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE, 12,5%). Em concentrações mais baixas de EHR, não foram observadas alterações no padrão de bandas de proteínas. No entanto, quando utilizada a proporção de 1:10 (veneno, m/m), observou-se interação entre as proteínas das peçonhas e o extrato, evidenciada por alterações indicadas por setas vermelhas (Figura 3).

Figura 3

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para análise da interação entre o extrato hidroalcoólico de *H. rubriflora* (EHR) e as peçonhas de *Bothrops leucurus* (BIV) e *B. jararaca* (BjV). O EHR foi diluído em PBS nas proporções de 1:0,01; 1:0,1; 1:1; e 1:10 (v:v). **A:** BIV:EHR. **B:** BjV:EHR. PM: Peso Molecular. Em destaque com setas vermelhas na proporção 1:10 a precipitação da banda pela ação do extrato.

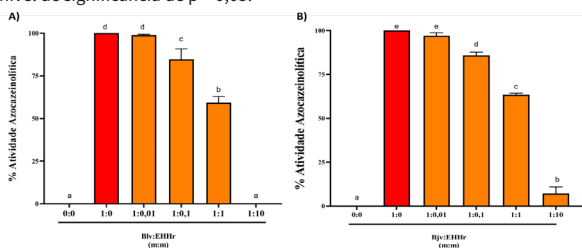


Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi analisada utilizando azocaseína como substrato (Figura 4). Verificou-se que a interação do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHR) com as peçonhas de *Bothrops jararaca* (BjV) e *Bothrops leucurus* (BIV) resultou em uma significativa inibição da atividade enzimática, observada a partir da proporção de 1:10 (veneno) para ambos os venenos.

Figura 4

Atividade proteolítica sobre substrato de azocaseína das peçonhas de *Bothrops leucurus* (BIV) e *B. jararaca* (BjV) e a inibição desta através de diferentes proporções do extrato hidroalcoólico de *H. rubriflora* (EHR). **A:** BIV:EHR. **B:** BjV:EHR. As barras expressas como média \pm SD (n = 3). abcd. Letras minúsculas diferentes indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme determinado pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, com um nível de significância de $p < 0,05$.

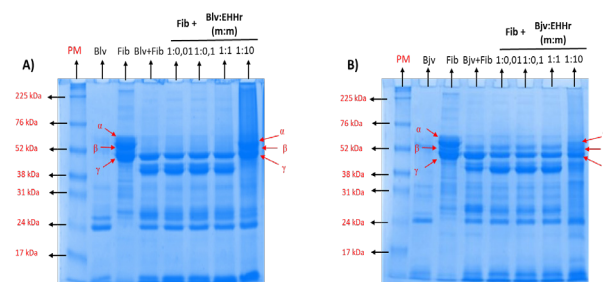


Inibição da atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica das peçonhas de *Bothrops jararaca* (BjV) e *Bothrops leucurus* (BIV) foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%). A avaliação dos géis revelou um padrão semelhante na degradação da cadeia α do fibrinogênio na presença de BIV (Figura 5-A) e BjV (Figura 5-B). Por outro lado, a cadeia β permaneceu parcialmente intacta na interação com BIV (com massa molecular entre 50 ~ 60 kDa), mas foi degradada na interação com BjV. A influência do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHR) sobre ambos os venenos foi observada. Na combinação BIV + EHR (Figura 5-A) na proporção de 1:10 (v:v), observou-se que as cadeias α e β do fibrinogênio permaneceram intactas, embora a coloração do extrato tenha dificultado a visualização. Um padrão similar foi observado na combinação BjV + EHR (Figura 5-B) na proporção de 1:10, onde a presença da cadeia α foi ausente em concentrações mais baixas do extrato devido à ação do veneno.

Figura 5

Atividade fibrinogenolítica das peçonhas de *Bothrops leucurus* (BIV) e *Bothrops jararaca* (BjV) e a inibição desta através de diferentes proporções do extrato hidroalcoólico de *H. rubriflora* (EHR). **A:** BIV: EHR. **B:** BjV:EHR. PM: Peso Molecular. Em destaque com setas vermelhas na proporção 1:10 as cadeias α e β do fibrinogênio são mantidas



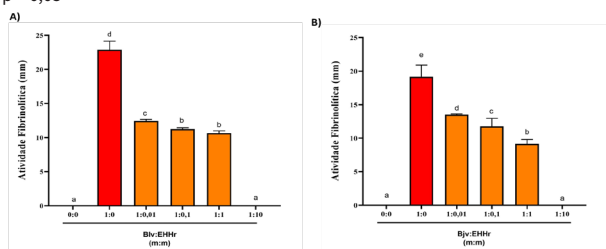
Inibição da atividade fibrinolítica

Para a análise fibrinolítica de BIV e BjV, as placas de fibrina foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após esse período, os venenos induziram halos de fibrinólise, confirmando suas atividades fibrinolíticas. O extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHR), por sua vez, demonstrou uma redução significativa na atividade fibrinolítica induzida

por BIV e BjV, conforme ilustrado na figura 6. Os gráficos apresentados nas figuras 6-A e 6-B mostram os resultados da atividade fibrinolítica de BIV e BjV, bem como a inibição por parte do EHHr, respectivamente. Conforme a concentração do extrato aumenta, o halo de fibrinólise diminui, chegando à inibição completa da fibrinólise induzida pelo veneno na concentração mais alta do extrato, que é na proporção de 1:10 (v:e).

Figura 6

Atividade fibrinolítica das peçonhas de *Bothrops leucurus* (BIV) e *B. jararaca* (BjV) e a inibição desta através de diferentes proporções do extrato hidroalcoólico de *H. rubriflora* (EHHr). Eixo X proporção veneno: extrato (v:e), eixo Y diâmetro do halo de fibrinólise em mm. **A:** BIV: EHHr. **B:** BjV:EHHr. As barras expressas como média \pm SD (n = 3). ^{abcde} Letras minúsculas diferentes indicam que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme determinado pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, com um nível de significância de $p < 0,05$



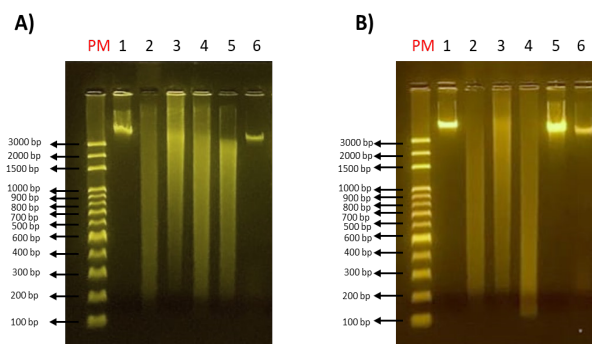
Inibição da Degradação do DNA

Nos resultados apresentados na figura abaixo, é possível observar a banda de DNA λ nas colunas 1 de ambas as figuras (A e B), que representa o DNA λ isolado. Ao adicionar o veneno à solução contendo DNA, ocorre a degradação completa em ambos os venenos (Figura 7 A e B - colunas 2). As colunas subsequentes em ambos os géis representam a combinação de 'DNA λ + veneno + extrato vegetal'.

Na figura A, que analisa a ação de *Bothrops leucurus* (BIV), o extrato apenas inibiu a degradação do DNA λ em sua concentração mais alta, ou seja, na proporção de 1:10 (v:e), conforme demonstrado na coluna 6. Quanto à figura B, que investiga a atividade de *Bothrops jararaca* (BjV), o extrato começou a inibir a degradação do DNA λ a partir da proporção de 1:1 (v:e), como evidenciado nas colunas 5 e 6.

Figura 7

Eletroforese em gel de agarose de DNA λ para análise de degradação de DNA por venenos de *B. jararaca* e *B. leucurus*. **A:** análise do veneno BIV; PM- Marcador molecular; 1- DNA λ ; 2- DNA λ + BIV; 3- DNA λ + BIV + EHHr (0,01); 4- DNA λ + BIV + EHHr (0,1); 5- DNA λ + BIV + EHHr (1); 6- DNA λ + BIV + EHHr (10). **B:** análise do veneno BjV; PM- Marcador molecular; 1- DNA λ ; 2- DNA λ + BjV; 3- DNA λ + BjV + EHHr (0,01); 4- DNA λ + BjV + EHHr (0,1); 5- DNA λ + BjV + EHHr (1); 6- DNA λ + BjV + EHHr (10)



DISCUSSÃO

A diversidade de metabólitos em plantas medicinais é extensivamente investigada devido ao potencial farmacológico dessas moléculas, especialmente no tratamento de doenças inflamatórias e respostas fisiopatológicas decorrentes de acidentes ofídicos (Adrião et al., 2022; Ferreira et al., 2022). Espécies como *Plathymenia reticulata* Benth. e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, ambas pertencentes à família Fabaceae, são exemplos notáveis. Essas plantas são conhecidas por suas frações de taninos que podem reduzir a atividade da peçonha de *Bothrops atrox*, através da desnaturação de proteínas presentes na peçonha, e polifenóis que interagem com a peçonha de *Bothrops jararacussu* (De Moura et al., 2016; Simas Pereira Junior et al., 2020).

Com base no perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHHr), foram identificados grupos de metabólitos que possuem potencial antiofídico. Um exemplo é o ácido gálico (AG), detectado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Estudos anteriores já documentaram que o ácido gálico pode interagir com toxinas presentes na peçonha de serpentes, inibindo completamente a atividade proteolítica e o complexo hemorrágico induzido por toxinas de serpentes como *Daboia russelli* (Costa et al., 2021; Mahadeswaraswamy et al., 2011).

A resposta inflamatória é uma das principais consequências do envenenamento por serpentes, desencadeando lesões teciduais provocadas pela ação de toxinas que afetam processos vasoativos locais. Isso resulta em um aumento significativo do fluxo sanguíneo, lesões nas membranas e aumento da permeabilidade capilar, levando ao extravasamento do conteúdo plasmático. Esse desequilíbrio na homeostase promove a liberação de mediadores inflamatórios, como mastócitos, células endoteliais, mononucleares e polimorfonucleares (Cardoso, 2009; Sunitha et al., 2015), que aumentam consideravelmente a geração de espécies reativas de oxigênio, desencadeando processos de estresse oxidativo.

O extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHHr) demonstrou um alto potencial antioxidante em todos os métodos analisados, corroborando resultados encontrados anteriormente na literatura (Miranda et al., 2020). Isso torna o uso do EHHr vantajoso no combate às toxinas das peçonhas de *Bothrops jararaca* (BjV) e *Bothrops leucurus* (BIV), uma vez que antioxidantes têm a capacidade de mitigar os efeitos oxidativos, como a prevenção da oxidação lipídica e a neutralização de radicais livres produzidos pelas toxinas do veneno botrópico (Pereañez et al., 2011; Silva et al., 2016; Souza et al., 2016).

A composição química da peçonha das serpentes consiste principalmente em proteínas e peptídeos. No gênero *Bothrops*, as metaloproteinases, serinoproteinases e fosfolipases A₂ correspondem a aproximadamente 71% do conteúdo da peçonha e são responsáveis pelas principais fisiopatologias do envenenamento, incluindo inflamação, hemorragia, miotoxicidade e necrose (Lorenzetti et al., 2005). A capacidade do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHHr) de interagir com o conteúdo proteico das peçonhas de *Bothrops jararaca* (BjV) e *Bothrops leucurus* (BIV) também foi investigada. O perfil eletroforético das peçonhas individuais e após a incubação com o extrato EHHr (Figura 3) foi analisado. Como demonstrado em estudos anteriores (Félix-Silva et al., 2017), os compostos químicos das plantas têm mostrado capacidade de interagir com as proteínas das peçonhas. De acordo com os resultados apresentados, observou-se a redução de proteínas da peçonha botrópica quando incubada com EHHr, a partir da proporção de 1:10 (p/p). Essa interação pode estar relacionada à ação dos

grupos de metabólitos investigados neste estudo, como os compostos fenólicos presentes no extrato de *H. rubriflora*, que podem quelar os metais presentes nas peçonhas, formando complexos maiores que impedem a penetração das proteínas na matriz do gel (Oliveira et al., 2022).

O potencial de inibição do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHHr) foi investigado em relação às atividades específicas de proteases. Os resultados deste estudo revelaram que o EHHr apresentou capacidade de inibir a atividade proteolítica sob a azocaseína dos venenos de *Bothrops jararaca* (BjV) e *Bothrops leucurus* (BIV). Na fisiopatologia do envenenamento por *Bothrops*, a ação proteolítica causa hemorragia, inflamação e miotoxicidade (Lorenzetti et al., 2005). Portanto, a identificação da inibição dessa atividade pelo EHHr sugere a possibilidade de redução dos efeitos danosos nos danos sistêmicos.

Outra atividade proteolítica avaliada foi a das metaloproteinases, que constituem cerca de 45% da peçonha de *Bothrops* (Oliveira et al., 2022), responsáveis pela degradação contínua do fibrinogênio e da fibrina. Essas proteases afetam diretamente os fatores de coagulação e degradam os componentes da matriz extracelular envolvidos na manutenção da estrutura e integridade dos capilares sanguíneos, podendo resultar em rompimento, edema e hemorragia (Oliveira et al., 2022; Patiño et al., 2010). De acordo com os resultados, o extrato hidroalcoólico de *H. rubriflora* (EHHr), na maior proporção de 1:10 (p/p), foi capaz de preservar a integridade das cadeias α e β do fibrinogênio, que são degradadas pela ação das metaloproteinases dos venenos de *Bothrops jararaca* (BjV) e *Bothrops leucurus* (BIV). Isso foi observado na atividade fibrinolítica, onde a maior proporção de EHHr reduziu a formação dos halos no substrato de fibrina. Atividades semelhantes foram relatadas anteriormente em outras espécies vegetais que apresentaram grupos de metabólitos como flavonoides, taninos, terpenos, esteroides e saponinas, capazes de interagir com as metaloproteinases ou com íons metálicos catalisadores e reguladores dessas reações (Chinnasamy et al., 2015; Daniele-Silva et al., 2024; Xiong et al., 2018).

Os danos ao DNA são causados pelas fosfolipases A₂ (PLA₂) presentes na peçonha, que desempenham um papel crucial na citotoxicidade e inflamação, prolongando e

potencializando seus efeitos. Em conjunto com a necrose e a rabdomiólise associadas ao envenenamento, essas enzimas têm uma significativa contribuição para o estresse oxidativo e inflamação (Sunitha et al., 2015). A análise da capacidade de inibição da degradação do DNA por extratos vegetais com potencial antiofídico não é tão comum quanto outros testes *in vitro*, o que torna esses resultados promissores e confirma a eficácia do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea rubriflora* (EHR) contra as toxinas presentes nos venenos de *Bothrops jararaca* (BjV) e *Bothrops leucurus* (BIV).

Devido à ação do veneno botrópico na cascata de coagulação, ativando o fator II (protrombina), a fibrina intravascular é convertida em produtos de degradação da fibrina. Isso resulta no consumo do fibrinogênio circulante, prolongando o tempo de coagulação ou levando à incoagulabilidade sanguínea, além do consumo dos fatores plasmáticos X, V e VIII (De Oliveira et al., 2008; Sano-Martins et al., 1995). Algumas plantas medicinais, como *H. rubriflora*, demonstram capacidade de inibir completamente essa ação em concentrações específicas, como confirmado neste estudo, o que resulta na inibição das atividades proteolítica, coagulante e hemorrágica da peçonha.

CONCLUSÃO

Os dados indicam que o extrato obtido das folhas de *Hymenaea rubriflora* possui um potencial significativo como tratamento adjuvante para envenenamentos botrópicos, apresentando em composição química compostos fenólicos que possuem a capacidade de inibir as atividades proteolítica, fibrinogenolítica, fibrinolítica e DNase dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops leucurus*. Esses resultados fornecem uma base sólida para futuras pesquisas, as quais devem explorar mais profundamente o potencial antiveneno de *H. rubriflora* e seus efeitos sobre os processos sistêmicos associados ao envenenamento botrópico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à agência brasileira CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Adrião, A. A. X., Santos, A. O., Lima, E. J. S. P., Maciel, J. B., Paz, W. H. P., Silva, F. M. A., Pucca, M. B., Moura-da-Silva, A. M., Monteiro, W. M., Sartim, M. A., & Koolen, H. H. F. (2022). Plant-derived toxin inhibitors as potential candidates to complement antivenom treatment in snakebite envenomations. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.842576>
- Albuquerque, P. L. M. M. N., Jacinto, C., Silva Junior, G. B., Lima, J. B., Veras, M. S. B., & Daher, E. F. (2013). Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: A review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(5), 295–301. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652013000500001>
- Bernarde, P. S. (2014). *Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil*. (1a. ed.). Anolisbooks.
- Boniface, P. K., Baptista Ferreira, S., & Roland Kaiser, C. (2017). Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 206, 193–223. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.024>
- Borges, L. P., & Amorim, V. A. (2020). Metabólitos Secundários de Plantas. *Revista Agrotecnologia - Agrotec*, 11(1), 54–67. <https://www.revista.ueg.br/index.php/agrotecnologia/article/view/9705>
- Brasil. (2024). Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan. *Acidente por Animais Peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net*. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>
- Cardoso, J. L. C. (2009). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. (2a. ed.). Servier.
- Carone, S. E. I., Menaldo, D. L., Sartim, M. A., Bernardes, C. P., Caetano, R. C., Silva, R. R., Cabral, H., Barraviera, B., Ferreira Junior, R. S., & Sampaio, S. V. (2018). BjSP, a novel serine protease from *Bothrops jararaca* snake venom that degrades fibrinogen without forming fibrin clots. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 357, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.08.018>
- Chinnasamy, S., Nagamani, S., & Muthusamy, K. (2015). Zn²⁺-ion of the snake venom metalloproteinase (SVMP) plays a critical role in ligand binding: a molecular dynamics simulation study. *RSC Advances*, 5(86), 70566–70576. <https://doi.org/10.1039/c5ra14693c>
- Costa, T. R., Francisco, A. F., Cardoso, F. F., Moreira-Dill, L. S., Fernandes, C. A. H., Gomes, A. A. S., Guimarães, C. L. S., Marcussi, S., Pereira, P. S., Oliveira, H. C., Fontes, M. R. M., Silva, S. L., Zuliani, J. P., & Soares, A. M. (2021). Gallic acid anti-myotoxic activity and mechanism of action, a snake venom phospholipase A2 toxin inhibitor, isolated from the medicinal plant *Anacardium humile*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 185, 494–512. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.163>

- Cruz, L. S., Vargas, R., & Lopes, A. A. (2009). Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethnicity & disease*, 19(1 Suppl 1), S1–46.
- Da Silva, W. R. G. B., Siqueira Santos, L., Lira, D., Oliveira Luna, K. P., Fook, S. M. L., & Alves, R. R. N. (2023). Who are the most affected by Bothrops snakebite envenoming in Brazil? A Clinical-epidemiological profile study among the regions of the country. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 17(10), e0011708. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011708>
- Daniele-Silva, A., Parente, A. M. E. S., Sousa Ferreira, S., Pontes da Silva, D., Torres-Rêgo, M., Cavalcanti, F. F., Assunção Ferreira, M. R., Freitas Fernandes-Pedrosa, M., & Lira Soares, L. A. (2024). In vitro and in vivo anti-inflammatory and antiofídico effects of the extract and fraction of *Eugenia uniflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 319(117223), 117223. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117223>
- De Moura, V. M., Costa Guimarães, N., Batista, L. T., Freitas-de-Sousa, L. A., Sousa Martins, J., Souza, M. C. S., Oliveira de Almeida, P. D., Monteiro, W. M., Oliveira, R. B., Dos-Santos, M. C., & Mourão, R. H. V. (2018). 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*, 213, 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.027>
- De Moura, V. M., Silva, W. C. R., Raposo, J. D. A., Freitas-de-Sousa, L. A., Dos-Santos, M. C., Oliveira, R. B., & Veras Mourão, R. H. (2016). The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. *Journal of Ethnopharmacology*, 183, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.047>
- De Oliveira, A. L., Freire Pinto, J. L., Fonseca, A. L., Caputto, L. Z., & Fonseca, F. L. A. (2008). Avaliação epidemiológica e laboratorial de pacientes que sofreram acidente ofídico na cidade de Miracatu (Vale do Ribeira, São Paulo). *Revista de patologia tropical*, 37(3). <https://doi.org/10.5216/rpt.v37i3.5070>
- De Veras, B. O., Oliveira, M. B. M., Oliveira, F. G. S., Santos, Y. Q., Oliveira, J. R. S., Lima, V. L. M., Almeida, J. R. G. S., Navarro, D. M. A. F., Aguiar, J. C. R. O. F., Aguiar, J. S., Gorlach-Lira, K., Assis, C. R. D., Silva, M. V., & Lopes, A. C. S. (2020). Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 247(112265), 112265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112265>
- Ducke, A. (1953). As leguminosas de Pernambuco e Paraíba. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 51, p. 417–461, 1953.
- Feitosa, E. S., Sampaio, V., Sachett, J., Castro, D. B., Noronha, M. D. N., Lozano, J. L. L., Muniz, E., Ferreira, L. C. L., Lacerda, M. V. G., & Monteiro, W. M. (2015). Snakebites as a largely neglected problem in the Brazilian Amazon: highlights of the epidemiological trends in the State of Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(suppl 1), 34–41. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0105-2013>
- Félix-Silva, J., Gomes, J. A. S., Xavier-Santos, J. B., Passos, J. G. R., Silva-Junior, A. A., Tambourgi, D. V., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2017). Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 125, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.260>
- Ferreira, S. S., Silva, D. P., Torres-Rêgo, M., Silva-Júnior, A. A., & Fernandes-Pedrosa, M. F. (2022). The potential of phenolic acids in therapy against snakebites: A review. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 208, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.12.019>
- Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (2013). Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 62, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006>
- Jorge, M. T., Cardoso, J. L. C., Castro, S. C. B., Ribeiro, L., França, F. O. S., Almeida, M. E. S., Kamiguti, A. S., Santo-Martins, I. S., Santoro, M. L., Mancau, J. E. C., Warrell, D. A., & Theakston, R. D. G. (1995). A randomized 'blinded' comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in São Paulo, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(1), 111–114. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90678-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90678-9)
- Jose, G. P., Santra, S., Mandal, S. K., & Sengupta, T. K. (2011). Singlet oxygen mediated DNA degradation by copper nanoparticles: potential towards cytotoxic effect on cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-9>
- Konrath, E. L., Strauch, I., Boeff, D. D., & Arbo, M. D. (2022). The potential of Brazilian native plant species used in the therapy for snakebites: A literature review. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 217, 17–40. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.08.002>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Longbottom, J., Shearer, F. M., Devine, M., Alcoba, G., Chappuis, F., Weiss, D. J., Ray, S. E., Ray, N., Warrell, D. A., Ruiz de Castañeda, R., Williams, D. J., Hay, S. I., & Pigott, D. M. (2018). Vulnerability to snakebite envenoming: a global mapping of hotspots. *Lancet*, 392(10148), 673–684. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31224-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31224-8)
- Lorencetti, T. T., Pereira, A. Z. P., Lopes, P. H., Pereira, E. R., Kizlyka, V., Pereira, L. F., & Elifio-Esposito, S. L. (2005). Purificação parcial de proteases do veneno de *Bothrops cotiara* (Serpentes: Viperidae). *Biology Studies*, 27(59). <https://doi.org/10.7213/reb.v27i59.21915>

- Lucas, E. P. R. (2009). *Estudo interlaboratorial para o estabelecimento do veneno botrópico e do soro antibotrópico de referência nacional*. [Dissertação de Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária]. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9519>
- Mahadeswaraswamy, Y. H., Kumar, M. S., Gowtham, Y. J., Nagaraju, S., Girish, K. S., & Kemparaju, K. (2011). The polyphenol 3, 4, 5 - Tri-hydroxy benzoic acid inhibits Indian Daboiia russelli venom and its hemorrhagic complex induced local toxicity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(20), 2520–2530. <https://doi.org/10.2174/156802611797633447>
- Matos, R. R., & Ignotti, E. (2020). Incidência de acidentes ofídicos por gêneros de serpentes nos biomas brasileiros. *Ciência & saúde coletiva*, 25(7), 2837–2846. <https://doi.org/10.1590/1413-81232020257.31462018>
- Miranda, P. H. O., Silva, G. C., Amorim, L. C., Veras, B. O., Alves, J. V. O., Assis, C. R. D., Rosa, M. M., Correia, M. T. S., & Silva, M. V. (2020). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activity from *Hymenaea rubriflora* Ducke (Fabaceae) leaf extract. *Brazilian Applied Science Review*, 4(5), 3259–3268. <https://doi.org/10.34115/basrv4n5-038>
- Muniz, E. G., Maria, W. S., Estevão-Costa, M. I., Buhnheim, P., & Chávez-Olortegui, C. (2000). Neutralizing potency of horse antivenom against Bothrops snake venoms from the Amazonian rain forest. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 38(12), 1859–1863. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00082-9)
- Oliveira, A. L., Viegas, M. F., Silva, S. L., Soares, A. M., Ramos, M. J., & Fernandes, P. A. (2022). The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nature Reviews Chemistry*, 6(7), 451–469. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00393-7>
- Omara, T. (2020). Plants used in antivenom therapy in rural Kenya: Ethnobotany and future perspectives. *Journal of Toxicology*, 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/1828521>
- Pacheco, A. G. M., Pacheco, E. J., Macedo, L. A. R. O., Silva, J. C., Lima-Saraiva, S. R. G., Barros, V. P., Oliveira-Junior, R. G., Branco, A., Quintans, J. S. S., Quintans-Junior, L. J., Coutinho, H. D. M., Menezes, I. R. A., & Almeida, J. R. G. S. (2022). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) in mice. *Brazilian Journal of Biology*, 82. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.240359>
- Patiño, A. C., Pereañez, J. A., Núñez, V., Benjumea, D. M., Fernandez, M., Rucavado, A., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2010). Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinolytic PI metalloproteinase from Colombian Bothrops atrox venom. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 56(6), 936–943. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.016>
- Pereañez, J. A., Núñez, V., Patiño, A. C., Londoño, M., & Quintana, J. C. (2011). Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase a2. *Revista Vitae*, 18(3), 295–304. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042011000300008
- Prazeres, L. D. K. T., Aragão, T. P., Brito, S. A., Almeida, C. L. F., Silva, A. D., Paula, M. M. F., Farias, J. S., Vieira, L. D., Damasceno, B. P. G. L., Rolim, L. A., Veras, B. O., Rocha, I. G., Silva Neto, J. C., Bittencourt, M. L. F., Gonçalves, R. C. R., Kitagawa, R. R., & Wanderley, A. G. (2019). Antioxidant and Antiulcerogenic Activity of the Dry Extract of Pods of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. (Fabaceae). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2019/1983137>
- Queiroz, G. P., Pessoa, L. A., Portaro, F. C. V., Furtado, M. F. D., & Tambourgi, D. V. (2008). Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 52(8), 842–851. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.002>
- Sano-Martins, I. S., Santoro, M. L., Morena, P., Sousa-e-Silva, M. C., Tomy, S. C., Antonio, L. C., Nishikawa, A. K., Gonçalves, I. L., Larsson, M. H., & Hagiwara, M. K. (1995). Hematological changes induced by Bothrops jararaca venom in dogs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28(3). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8520523/>
- Silva, T. P., Moura, V. M., Souza, M. C. S., Santos, V. N. C., Silva, K. A. M. M., Mendes, M. G. G., Nunez, C. V., Almeida, P. D. O., Lima, E. S., Mourão, R. H. V., & Dos-Santos, M. C. (2016). *Connarus favosus* Planch.: An inhibitor of the hemorrhagic activity of Bothrops atrox venom and a potential antioxidant and antibacterial agent. *Journal of Ethnopharmacology*, 183, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.043>
- Simas Pereira Junior, L. C., Coriolano de Oliveira, E., Valle Rorig, T. D., Pinto de Araújo, P. I., Sanchez, E. F., Garrett, R., Palazzo de Mello, J. C., & Fuly, A. L. (2020). The plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville as a neutralizing source against some toxic activities of Bothrops jararacussu snake venom. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 186, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.011>
- Souza, I. M., Funch, L. S., & De Queiroz, L. P. (2016). Flora da Bahia: Leguminosae – *Hymenaea* (Caesalpinioideae: Detarieae). *Sitientibus série Ciências Biológicas*, 16.
- Sunitha, K., Hemshekhar, M., Thushara, R. M., Santhosh, M. S., Sundaram, M. S., Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2015). Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 98, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.014>
- Upasani, S. V., Beldar, V. G., Tatiya, A. U., Upasani, M. S., Surana, S. J., & Patil, D. S. (2017). Ethnomedicinal plants used for snakebite in India: a brief overview. *Integrative Medicine Research*, 6(2), 114–130. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.03.001>
- Vale, C. R., Silva, C. R., Oliveira, C. M. A., Silva, A. L., Carvalho, S., & Chen-Chen, L. (2013). Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic, and recombinogenic activities of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice. *Genetics and molecular research: GMR*, 12(3), 2712–2724. <https://doi.org/10.4238/2013.july.30.9>

- Wagler, J. (1824). *Serpentum Brasiliensium species novae, ou histoire naturelle des espèces nouvelles de serpens*. In Jean de Spix, *Animalia nova sive species novae*. [Natrix bahiensis: 27. Monaco, Typis Franc. Seraph. Hübschmanni, VII. 75 pp.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (2^a. ed.). Springer Science & Business Media.
- Wang, J.-P., Ruan, J.-L., Cai, Y.-L., Luo, Q., Xu, H.-X., & Wu, Y.-X. (2011). In vitro and in vivo evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(3), 1033–1038. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.02.010>
- Wied-Neuwied, M. (1824). Prinz Zu. Abbildungen zur Naturgeschichte Brasiliens. *Isis von Oken*, 15, 1103.
- World Health Organization. (2007). *Rabies and envenomings: A neglected public health issue: Report of a consultative meeting, world health organization*, Geneva, 10 January 2007. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/43858>
- Xiong, Y., Li, B., Huang, D., He, Q., & Yu, X. (2018). Anti-Deinagkistrodon acutus venom properties of ethanolic root extract from *Cynanchum paniculatum* (Bunge) kitag and its GC-MS analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 225, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.002>