

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Efeito do extrato hexânico de *Capsicum chinense* Jacq. na
inflamação induzida pelo veneno de *Bothrops matto grossensis***

Autor: Herbert Patric Kellermann Cleveland
Orientadora: Dra Susana Elisa Moreno

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Setembro – 2014

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Efeito do extrato hexânico de *Capsicum chinense* Jacq. na
inflamação induzida pelo veneno de *Bothrops matogrossensis***

Autor: Herbert Patric Kellermann Cleveland
Orientadora: Dra Susana Elisa Moreno

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para
obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA,
no Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia da
Universidade Católica Dom Bosco - Área de
concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde”

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Setembro – 2014

Ficha catalográfica

Cleveland, Herbert Patric Kellermann

C635e Efeito do extrato hexânico de *Capsicum chinense* Jacq. na inflamação induzida pelo veneno de *Bothrops mattogrossensis* / Herbert Patric Kellermann Cleveland; orientação Susana Elisa Moreno. 2014
74 f. + anexos

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2014.

1. Biotecnologia 2. Cobra venenosa – Veneno 3. Envenenamento
4. Ofidismo I. Moreno, Susana Elisa I. Título

CDD – 615.942

**Efeito do Extrato de *Capsicum chinense* Jacq. na Inflamação Induzida
pelo Veneno de *Bothrops matogrossensis***

Autor: Herbert Patric Kellermann Cleveland
Orientadora: Profa. Dra. Susana Elisa Moreno

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

APROVADO em 26 de setembro de 2014.



Profa. Dra. Susana Elisa Moreno - UCDB
(orientadora)



Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho - UCDB



Prof. Dr. Octavio Luiz Franco - UCB

O piloto não abandona o navio diante da tempestade
porque não pode domar o vento.

(Thomas Moore).

Dedico este trabalho,

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente guiando-me na realização de novos projetos.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e não mediram esforços para promover minha formação pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por serem minha base e suporte emocional e financeiro, por terem estado sempre ao meu lado nos momentos difíceis, sem vocês esta conquista não seria possível;

À Profa. Dra. Susana Elisa Moreno que me recebeu em seu laboratório de portas abertas, pela orientação, pelos ensinamentos, paciência e incentivo;

À equipe do laboratório de Farmacologia e Mutagênese da UCDB, em especial à Danieli Fernanda Buccini, pela ajuda com as técnicas e na realização de alguns ensaios, por ter me ajudado a sanar dúvidas durante os experimentos;

À Profa. Msc. Paula Helena Santa Rita, pela amizade, pelo incentivo e pelo exemplo profissional que tem sido desde que pisei pela primeira vez em um laboratório;

À equipe do Biotério UCDB, pela amizade e apoio na conclusão do trabalho e em especial ao Breno, responsável pela ala de roedores, que fez o possível para garantir o fornecimento dos camundongos sempre que precisei;

À todos os técnicos do Bio-Saúde, pela ajuda recebida em diversos momentos ao longo dos experimentos;

Aos meus amigos Andriolli Costa, André Centeno, Ricardo Tiosso, Thabata Borine, Wesley Covre, Daniel Irineu, Ana Carolina Pires, Thiago Russo, Gisele Bertolazo, pelo incentivo e apoio, pela amizade e os momentos de descontração;

A minha namorada Ana Alice, pelo amor, companheirismo, por me incentivar e ajudar a conseguir forças nos momentos mais difíceis;

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa, muito obrigado.

SUMMÁRIO

	Páginas
1.INTRODUÇÃO	11
1.1 Acidentes ofídicos	11
1.2 <i>Bothrops matto grossensis</i>	12
1.3 Sinais de envenenamento botrópico	15
1.4 Constituição do veneno botrópico	16
1.5 Reação inflamatória aguda no envenenamento botrópico	18
1.6 Tratamento de envenenamento botrópico	21
1.6.1 Plantas com Atividade Antiofídica/ Alexiteria	21
1.7 <i>Capsicum chinense</i>	23
2.OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos Específicos	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
Artigo: Efeito do extrato hexânico de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. na inflamação induzida pelo veneno de <i>Bothrops matto grossensis</i> .	42
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Animais	44
2.2 Veneno	45
2.3 Extrato de <i>Capsicum chinense</i>	45
2.4 Protocolo de eutanásia	45
2.5 Curva dose resposta veneno	45
2.6 Curva dose resposta extrato	46
2.7 Atividade anti-inflamatória – migração de neutrófilos	46
2.8 Atividade anti-inflamatória – ação antiedematogênica	47
2.9 Análise estatística	47
4 RESULTADOS	47
4.1 Curva dose resposta de VBM	47
4.2 Curva dose resposta extrato hexânico bruto	49

4.3 Efeito da Dose Resposta do Extrato Hexânico Bruto da Variedade Bode de <i>Capsicum chinense</i> Sobre a Migração de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal de Camundongos	51
4.4 Efeito da Dose Resposta do Extrato Hexânico Bruto da Variedade Bode de <i>Capsicum chinense</i> Sobre o Edema de Pata em Camundongos	52
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
6. Anexo I – Guide for authors, Toxicon	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécime de *Bothrops matogrossensis* mantido em cativeiro no Biotério da Universidade Católica Dom Bosco. 14

Figura 2: Envenenamento botrópico. Imagem (a): edema no pé esquerdo causado pelo veneno. Imagem (b): necrose em envenenamento por *Bothrops* sp. 16

Figura 3. Sequencia geral de acontecimentos característicos da inflamação aguda. 19

Figura 4: *Capsicum chinense*. (a) Variedade biquinho; (b) Variedade Bode amarela; (c) Variedade Bode vermelha. 24

ARTIGO

Figura 1: Curvas de dose resposta de veneno de *Bothrops matogrossensis* em teste de migração de neutrófilos em camundongos. 48

Figura 2: Avaliação do efeito hexânico bruto de *Capsicum chinense* variedade Bode sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por diferentes concentrações de veneno de *Bothrops matogrossensis*. 50

Figura 3: Efeito em períodos diferentes do extrato hexânico de *Capsicum chinense* variedade Bode sobre a migração de neutrófilos em cavidade peritoneal de camundongos induzida por veneno de *Bothrops matogrossensis*. 51

Figura 4: Efeito em períodos diferentes do extrato hexânico de *Capsicum chinense* variedade Bode na formação de edema de pata induzida em camundongos por veneno de *Bothrops matogrossensis*. 52

LISTA DE ABREVIATURAS

Kg – kilogramas

mg – miligramas

µg – microgramas

µL – microlitros

Pim. – extrato de pimenta

VBM – veneno de *Bothrops mattogrossensis*

i.p. – intraperitoneal

s.p. – subplantar

s.c. – subcutâneo

rpm – rotações por minuto

Efeito do extrato hexânico de *Capsicum chinense* Jacq. na inflamação induzida pelo veneno de *Bothrops mattogrossensis*

Resumo

A soroterapia é o único tratamento reconhecido para envenenamento ofídico. Mesmo quando administrado, o soro não reduz eficazmente os efeitos locais dos venenos. Envenenamento por *Bothrops mattogrossensis* é caracterizado por reações locais como necrose e inflamação intensa, constituída pela formação de edema e migração leucocitária. Vários extratos de origem vegetal têm combatido eficazmente estes efeitos. *Capsicum chinense* apresenta compostos comumente atribuídos à inibição do veneno. Foi avaliada a capacidade do extrato hexânico de *Capsicum chinense* de inibir a formação de edema e migração de neutrófilos induzidas por veneno de *Bothrops mattogrossensis*. Foi avaliada a influência na migração de neutrófilos das doses de 5, 10 e 15mg/kg do extrato após 6 h e 15mg/kg 12h após a inoculação de 30µg de veneno. Também foi avaliado o efeito de 15mg/kg de extrato sobre a formação de edema de pata nos intervalos de 15, 30, 60, 120 e 240minutos após a inoculação de 30µg de veneno. Apenas a dosagem de 15mg/kg conseguiu reduzir significativamente a migração de neutrófilos com relação ao controle. As dosagens menores não apresentaram diferença com o controle. O extrato não conseguiu reduzir significativamente o edema de pata com relação ao controle positivo em nenhum dos intervalos analisados. Porém a dosagem de 15mg/kg conseguiu reduzir significativamente a migração com relação ao controle positivo para os intervalos de 6 e 12 horas pós inoculação. Portanto estes resultados demonstram que *Capsicum chinense* possui em sua composição substâncias capazes de inibir alguns efeitos do processo inflamatório induzido pelo veneno de *Bothrops mattogrossensis*.

Palavras-chave: envenenamento, ofidismo, extratos vegetais, alexiteria.

Effect of *Capsicum chinense* Jacq. Hexanic extract on inflammation induced by *Bothrops mattogrossensis* venom

Abstract

The antivenom serum is the only recognized treatment for snake envenomation. Even when administered, the serum does not effectively reduce the local effects of venoms. *Bothrops mattogrossensis* envenomation is characterized by local reactions such as necrosis and severe inflammation, consisting of edema formation and leukocyte migration. Various plant extracts have effectively countered these effects. *Capsicum chinense* provides compounds commonly attributed to venom inhibition. The ability of the hexane *Capsicum chinense* extract to inhibit the edema formation and neutrophil migration induced by *Bothrops mattogrossensis* venom was evaluated. We analyze the influence of neutrophil migration doses of 5, 10 and 15 mg/kg of the extract after 6 h and 15 mg/kg 12 hours after inoculation of 30µg of venom. The effect of 15 mg/kg of the extract on mice paw edema formation in the intervals of 15, 30, 60, 120 and 240 minutes was also evaluated after inoculation of 30µg venom. Only the dosage of 15 mg/kg was able to significantly reduce neutrophil migration compared to control. Smaller dosages showed no difference with the control. The extract failed to significantly reduce edema in relation to positive control in any of the intervals. However, the dose of 15 mg/kg was able to significantly reduce migration with respect to positive control for the ranges 6 and 12 hours after inoculation, and not alter the number of neutrophils in the intervals while the increased positive control the influx. Therefore these results demonstrate that *Capsicum chinense* has in its composition substances capable of inhibiting some effects of the inflammatory process induced by *Bothrops mattogrossensis*.

Palavras-chave: envenomation, ofidism, plant extract, alexitery.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acidentes Ofídicos

Há atualmente cerca de 3432 espécies de serpentes no mundo distribuídas em pelo menos 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, BÉRNILS e COSTA (2012) apontam a presença de pelo menos 386 espécies de serpentes correspondentes a 11,2% do total de espécies conhecidas. Aproximadamente um quinto das espécies existentes são peçonhentas e são comumente envolvidas em acidentes ofídicos. Ao redor do mundo, são estimados 421.000 novos acidentes ofídicos resultando em pelo menos 20.000 mortes todo ano (OMS, 2014). Estes números, no entanto são bastante variáveis na literatura (GUTIÉRREZ, 2012; de OLIVEIRA *et al.*, 2014; WHITE, 2005), provavelmente por se tratar de uma doença negligenciada (OMS, 2014).

A maior parte dos acidentes ofídicos ocorre em regiões rurais da África, Ásia, América Latina e Oceania (GUTIÉRREZ *et al.*, 2011; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009) onde o acesso imediato ao soro antiofídico não existe (SAÉZ e SOTO, 2009). Nos países tropicais e neotropicais, por exemplo, a incidência é maior nas áreas rurais, com destaque para o Brasil e Birmânia, cada um com mais de 2000 casos anuais (STEWART, 2003).

No início da década de 90, ocorriam em média 20.000 acidentes ofídicos no Brasil, dos quais 132 resultavam em morte, por ano, estes números correspondem a, respectivamente, 60% e 78% do total de acidentes e mortes por animais peçonhentos no Brasil (BOCHNER, 2003; FUNASA, 2001). Segundo de PAULA (2009), de 2001 a 2006, foram registrados 49.650 casos de acidentes com serpentes no país, sendo 1.200 fatais. Esses ataques são mais frequentes nos meses quentes e chuvosos, correspondentes aos meses de setembro a março, e nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. A maioria das vítimas é do sexo masculino, com idade entre 15 anos e 49 anos, que são atingidos principalmente nas pernas (70% dos casos). Porém, no trabalho de BOCHNER e STRUCHINER (2002) é possível notar uma queda no número de notificações de acidentes realizados por municípios e estados a partir de 1995, que os autores relacionam essa queda à mudança de sistema de notificação, ou ainda, à diminuição do esforço perante dados que permaneciam estáveis ao longo dos anos, levando inclusive à não publicação de dados de acidentes por animais peçonhentos no Informe epidemiológico do SUS (BOCHNER, 2003; BOCHNER e STRUCHINER, 2002). Ainda assim o Ministério da Saúde apontou 26.665 novos acidentes ofídicos no ano de 2009 (MS, 2010).

Cerca de 90% dos acidentes ofídicos são causados por jararacas (gênero *Bothrops*) (BARRAVIEIRA, 1993; FUNASA, 2001) enquanto as cascavéis (gênero *Crotalus*) são responsáveis por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, podendo

representar até 30% dos acidentes em algumas regiões (FUNASA, 2001). Ambos os gêneros juntos com o gênero *Lachesis*, são membros da família Viperidae, que é responsável por aproximadamente 99% dos acidentes, sendo o restante responsabilidade da família Elapidae, constituída pelas corais verdadeiras. Embora as jararacas sejam responsáveis pela maioria absoluta dos acidentes no país, o maior coeficiente de letalidade é da cascavel, devido à frequência com que evolui para insuficiência renal aguda. De 1990 a 1993, dos 59.619 acidentes com *Bothrops* 185 evoluíram para óbitos, resultando em 0,31% de letalidade; já com a cascavel, dos 5.072 acidentes 95 levaram a óbitos, resultando em 1,87% de letalidade (FUNASA, 2001). Em dados recentes, o Ministério da Saúde (MS, 2010) apontou a novos valores de letalidade para acidentes crotálicos (1,25%), elapídico (1,02%), laquético (0,7%) e botrópico (0,35%). Antes da produção e distribuição do soro anti-ofídico por Vital Brazil em 1901, era estimada uma letalidade de 25% entre as vítimas de acidentes ofídicos no Estado de São Paulo (BRAZIL 1901). E embora os acidentes com *Bothrops* (botrópicos) tenham a menor letalidade, a frequência de sequelas é bem elevada, em torno de 10% (MS-Brasil,2010).

O gênero *Bothrops* possui mais de 44 espécies que estão distribuídas do sul do México a Argentina e em algumas ilhas do Caribe (CAMPBELL e LAMAR, 1989; GREENE, 2000). Pelo menos 27 destas espécies estão presentes no Brasil (BÉRNILS e COSTA, 2012) distribuídas amplamente pelo território nacional (GRANTS AU, 1928). As espécies que representam a maior importância devido a sua extensa distribuição geográfica são *Bothrops erythromelas* no Nordeste, *Bothrops atrox* na Amazonia, *Bothrops moojeni* no Centro-Oeste e Sudeste, *Bothrops jararaca* no Sul e Centro-Oeste e *Bothrops jararacussu*, encontrada predominantemente no Sul e Sudeste (MELGAREJO, 2003). Várias espécies anteriormente compreendidas dentro de *Bothrops neuwiedi* tem marcada presença em todas as regiões do país sendo *Bothrops matogrossensis* a representante do grupo no estado de Mato grosso do Sul (SILVA e RODRIGUES, 2008).

1.2 *Bothrops matogrossensis*

O complexo *Bothrops neuwiedi* chegou a compreender 12 subespécies, que seriam populações que ocupavam diferentes áreas de distribuição, porém SILVA (2004) e SILVA e RODRIGUES (2008), observando os padrões morfológicos e de distribuição promoveram várias destas subespécies, como *B. matogrossensis*, *B. pubescens* e *B. paolensis* à categoria de espécie. Em 2009, FENWICK et al. (2009) ao analisar o gênero utilizando características

moleculares, sugeriram um deslocamento de gênero para várias espécies, como por exemplo *B. alternatus*, que foi apontada como pertencente ao gênero *Rhinocerophis* e *B. mattogrossensis* que foi alocada no gênero *Bothropoides*. Apesar dessas várias mudanças terem ocorrido, estas não são tão ativamente seguidas por todos os pesquisadores, ficando por vezes, restritas a zoólogos e taxonomistas. Um exemplo disso é o trabalho de BERNARDE (2011), que apresentou uma lista atualizada para facilitar o acompanhamento da situação sistemática pelos profissionais da saúde. Porém CARRASCO *et al.* (2012) sinonimizaram os gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocopias*, *Bothropoides* e *Rhinocerophis* com *Bothrops*, voltando então, muitas das espécies, ao nome anterior ao trabalho de FENWICK *et al.* (2009) e, consequentemente *Bothropoides mattogrossensis* voltou a ser *Bothrops mattogrossensis*. E recentemente, WALLACH *et al.* (2014) em seu catálogo, voltaram a referir-se à espécie como *Bothropoides mattogrossensis*, porém, por limitar-se a listar espécies, seus holótipos e parátipos, não apresenta propriedade de alterar novamente a classificação da espécie, sendo *Bothrops mattogrossensis* a atual classificação.

Bothrops mattogrossensis (Figura 1) é uma espécie encontrada em áreas úmidas do Pantanal brasileiro, bem como Bolívia, Paraguai, norte da Argentina, e os estados brasileiros Amazonas, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Tocantins, Goiás e São Paulo (MONTEIRO *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2004). A maior abundância desta espécie ocorre no estado de Mato Grosso do Sul, nas regiões próximas a Miranda, seu local-tipo (SILVA e RODRIGUES, 2008). Possui hábitos alimentares generalistas não possuindo nenhuma presa que responda por 50% da sua alimentação, que inclui tanto presas endotérmicas quanto peclotérmicas, embora seja a espécie de *Bothrops* com maior proporção de anuros na dieta (MARTINS *et al.*, 2002) o que a levou a ser conhecida como boca-de-sapo.

SILVA e RODRIGUES (2008) descrevem como características da espécie pigmentação uniforme em todas as escamas supralabiais ou grandes marcas escurecidas cobrindo mais de 50% das supralabiais. Manchas dorsolaterais com contornos bem definidos destacando-se da coloração do restante do corpo. Normalmente essas manchas dorsolaterais são divididas verticalmente a partir do meio do corpo. Listras normalmente ausentes. E quando presentes, nunca maiores que a região occipital. Não apresenta melanismo na cabeça. Listra pósocular bem definida e quilhas sempre da mesma coloração que as escamas dorsais. Há manchas menores entre duas manchas maiores consecutivas. Manchas dorsolaterais variáveis. 20 a 32 escamas na linha sagital iniciando após as internasais; 1 ou 2 linhas de escamas entre a subocular e a quarta supralabial; 6 a 11 supralabiais; 7 a 13 infralabiais; 20 a 29 dorsais no

início do tronco; 21 a 28 dorsais no meio do tronco; 162 a 187 ventrais em fêmeas; 162 a 185 ventrais em machos; 37 a 55 subcaudais em fêmeas; 40 a 61 subcaudais em machos. As bordas das manchas dorsolaterais apresentam contornos bem definidos. Destacando-se da coloração do resto do corp. manchas occipitais prolongadas, mas raramente excedendo a linha da articulação mandibular. As manchas dorsolaterais são compostas por 16 a 33 escamas. as manchas dorsolaterais do meio do corpo apresentam 1 a 6 escamas na margem superior, 3 a 8 linhas de escamas na parte principal, 3 a 7 escamas na margem inferior da parte principal, 8 a 12 linhas de escamas de altura total, 3 a 9 linhas de largura, 0 a 7 escamas separando esta mancha da anterior e 0 a 6 da posterior coloração do corpo variando de marrom claro para marrom oliva escuro. As manchas dorsolaterais são marrom escuras ou pretas e podem apresentar margens brancas.



Figura 1. Espécime de *Bothrops mattogrossensis* mantido em cativeiro no Biotério da Universidade Católica Dom Bosco.

Esta espécie apresenta dimorfismo sexual, com a fêmea apresentando corpo maior ao do macho e o macho apresentar cauda maior à da fêmea, isto se deve provavelmente à necessidade de estocagem de ovos e do hemipênis, respectivamente (SHINE, 1993). Sua reprodução é sazonal, isto é, seu investimento reprodutivo sofre variação ao longo do ano conforme as características climáticas do ambiente. A vitelogênese e os nascimentos ocorrem na estação chuvosa do Pantanal (outubro a março) (ALMEIDA-SANTOS e SALOMÃO, 2002; MONTEIRO *et al.*, 2006).

A presença de presas de *Bothrops matogrossensis* é maior na estação chuvosa, o que aliado a seu comportamento reprodutivo, faz com que sua atividade seja maior neste período, concentrando também, o maior número de encontros e acidentes.

1.3 Sinais de envenenamento botrópico

A fisiopatologia do envenenamento por serpentes envolve uma complexa série de eventos que dependem da ação combinada dos componentes do veneno (GUTIÉRREZ, 2002). Apesar da conhecida variação em sua composição, PEREIRA (2007) explica que, quanto ao quadro fisiopatológico do envenenamento, as espécies de *Bothrops*, mantem relativa semelhança (CHIPPAUX et al., 1991).

Os venenos ofídicos têm sido divididos, de acordo com seu efeito, em dois grupos (CHIPPAUX, 2002; CHIPPAUX *et al.*, 1991; HARVEY, 1991; TU, 1977): os hemopáticos que promovem disfunção do sistema circulatório e os neurotóxicos, que afetam o sistema nervoso e ligação neuromuscular. Entretanto os venenos podem compartilhar ambos os tipos de ações, mas com o predomínio de uma delas. SAÉZ e SOTO (2009) ainda apontam a existência de um terceiro grupo, chamado de proteolítico. Em uma abordagem similar, focando os quadros clínicos causados por picaduras, SAÉZ e SOTO (2009), descreveram dois tipos: o cobraico, caracterizado por um ataque neurológico e circulatório com paralisia respiratória, insuficiência renal e transtornos neuromusculares; e o viperino, associado a síndromes locais caracterizados por edemas, dor, necrose, gangrenas gasosas e principalmente ataques à hemóstase (mecanismos de regulação de perda de sangue).

O quadro clínico por envenenamento botrópico (Figura 2), é principalmente caracterizado, e identificado com relativa facilidade por intensas reações locais como hemorragia, mionecrose, equimose, inflamação (edema intenso e dor) (FRANCO, 2003; GUTIÉRREZ, 1995; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; ROSENFELD, 1971; TEIXEIRA *et al.*, 2009; TRIBUIANI *et al.*, 2014; WARREL, 2004). Além de manifestações sistêmicas como alterações na homeostasia (FRANCO, 2003), caracterizadas pela deficiência da coagulação, da agregação plaquetária e depleção de fibrinogênio (GUTIERREZ, 1995; HATI *et al.*, 1999), alterações do sistema cardiovascular, levando ao choque hipovolêmico, bem como à insuficiência renal aguda nos casos mais graves (AMARAL *et al.*, 1985; GUTIÉRREZ, 1995; WARREL, 2004).



Figura 2. Envenenamento botrópico. Imagem (a): Edema no pé esquerdo causado pelo veneno de *Bothrops*. Imagem (b): Necrose por envenenamento de *Bothrops*.

Fonte: (a): <http://biologiaeterna.blogspot.com.br>

(b): <http://medicinafontes.blogspot.com.br>

A reação inflamatória é a principal manifestação clínica do envenenamento por *Bothrops* (ROSENFELD, 1971), que se manifesta como um quadro de inflamação aguda (SOUZA, 2010).

1.4 Constituição do Veneno botrópico

Os venenos de serpentes são produzidos em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas, compostas principalmente de proteínas e polipeptídeos (FURTADO *et al.*, 1991). Há uma reconhecida variação na composição do veneno não só entre espécies da mesma família e gênero, mas também inter e intra-específicas, devido a distribuição geográfica, idade (CHIPPAUX *et al.*, 1991) sexo e sazonalidade (MIRTSCHIN *et al.*, 2002).

Dentre os componentes mais comuns do veneno, são encontradas fosfolipases A₂ (PLA₂), miotoxinas, metaloproteases, hemorraginas, serinoproteases (BRAUD *et al.*, 2000; GUTIÉRREZ, 2002; OWNBY, 1990; SOARES *et al.*, 2004) e L-aminoácido oxidases (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). A ação destes vários componentes é responsável pelo complexo quadro clínico observado (GUTIERREZ, 2002).

Há uma reconhecida variação na composição do veneno não só entre espécies da mesma família e gênero, mas também inter e intra-específicas, devido a distribuição geográfica, idade (CHIPPAUX *et al.*, 1991) sexo e sazonalidade (MIRTSCHIN *et al.*, 2002)

Metaloproteases são divididas em quatro classes básicas de acordo com sequências de aminoácidos encontrados em seus cDNAs (BJARNASON e FOX, 1995), apresentando também

diferença de peso molecular e intensidade de hemorragia induzida (OLIVEIRA, 2009). Estas proteínas participam do processo hemorrágico através da degradação da membrana basal dos capilares sanguíneos, e do estroma local, levando ao rompimento da rede de capilares, edema e hemorragia (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005) a través do escape de eritrócitos, plasma e mediadores inflamatórios (COLLINS, 1999). Também são capazes de degradar proteínas da cascata da coagulação sanguínea, tais como fibrinogênio, fibrina e fator von Willebrand (SERRANO *et al.*, 2007). GUTIÉRREZ *et al.* (1995) observou a capacidade metaloproteases de induzir edema em pata de camundongo. Também tem sido descrita na literatura que estas enzimas induzem migração de neutrófilos e macrófagos (TEIXEIRA *et al.*, 2009) e ativam o sistema complemento (FARSKY *et al.*, 2000).

As serinoproteases apresentam um perfil farmacológico bem diverso, que inclui ação nas proteínas da cascata de coagulação, atividade Trombina-like sobre o fibrinogênio, ativação do fator V e da proteína C reativa, fibrinogenólise, ativação do plasminogênio e indução de agregação plaquetária (SERRANO e MAROUN, 2005). Algumas serinoproteases também apresentam função calicreína-like, liberando bradicinina, promovendo vasodilatação (SERRANO e MAROUN, 2005). A maior parte destas atividades estão associados aos distúrbios sistêmicos do envenenamento por *Bothrops* (PATIÑO *et al.*, 2013). Na inflamação, seu papel predominante é o de ativar metaloproteases endógenas (SARAVIA-OTTEN *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

O efeito conjunto das serinoproteases e metaloproteases sobre os mecanismos de coagulação levam à incoagulabilidade sanguínea, caracterizada clinicamente por sangramentos espontâneos, como, gengivorragia (SOUZA, 2010).

As PLA₂ encontradas em células de mamíferos apresentam diferenças de atividade, agindo sobre a regulação do metabolismo de ácido araquidônico, turnover de fosfolípidos e controle de processos inflamatórios envolvendo ácido araquidônico (MURAKAMI *et al.*, 1998). Numerosos estudos também têm mostrado que as PLA₂ botrópicas estão envolvidas na resposta inflamatória induzida pelo veneno como edema, dor, migração de leucócitos (MOREIRA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2003; TICLI *et al.*, 2005) e necrose (GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003; RODRIGUES, 2007; TICLI, 2005).

As PLA₂ secretadas no veneno de serpentes promovem a liberação de lisofosfolípidos e ácidos graxos, como o ácido araquidônico. Este, por sua vez, é precursor de prostaglandinas e leucotrienos e está envolvido no processo inflamatório caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular e formação de edema, bem como recrutamento de neutrófilos,

nocicepção e liberação de mediadores de inflamação que mimetizam alguns sintomas de inflamação sistêmicas e locais (ARNIEWARD, 1996; IGLESIAS *et al.*, 2005; KOH *et al.*, 2006). OLIVO *et al.* (2007) também aponta que o ácido araquidônico e seus metabólitos contribuem para a formação de edema no quadro de envenenamento ofídico.

Dentre as PLA₂, também estão as miotoxinas, que atuam diretamente sobre a membrana da célula muscular, causando a mionecrose que é típica do envenenamento por *Bothrops* (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995).

1.5 Reação inflamatória aguda no envenenamento botrópico

A inflamação é uma resposta imediata e inicial do organismo a um agente lesivo, podendo este ser exógeno (agentes infecciosos, traumas físicos ou químicos) ou endógenos (imunológicos, neurológicos). A característica fundamental da reação inflamatória é que, apesar da complexidade do processo, ou da de sua causa, ela se manifesta de maneira estereotipada (PATRÃO-NETO *et al.*, 2013; PEREIRA, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

A inflamação aguda, primeira fase do processo inflamatório, é evidenciado pela observação de fenômenos estruturais e funcionais que ocorrem na microcirculação e no tecido intersticial adjacente: calor, rubor, tumor e dor e perda de função do tecido (PEREIRA, 2009).

No início do processo inflamatório (figura 3), uma rápida vasoconstrição seguida de vasodilatação e aumento de fluxo sanguíneo promovem um escape de ultrafiltrado com poucas proteínas chamado transudato, devido às diferenças de pressão hidrostática. Logo após, um aumento na permeabilidade da parede dos vasos leva ao escape para o interstício do exsudato, líquido rico em proteínas e leucócitos. Esta migração, por sua vez, aumenta a pressão osmótica do líquido intersticial o que leva a um acentuado fluxo e acúmulo de líquido extra vascular no tecido intersticial, caracterizando o edema (COTRAN *et al.*, 1992; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

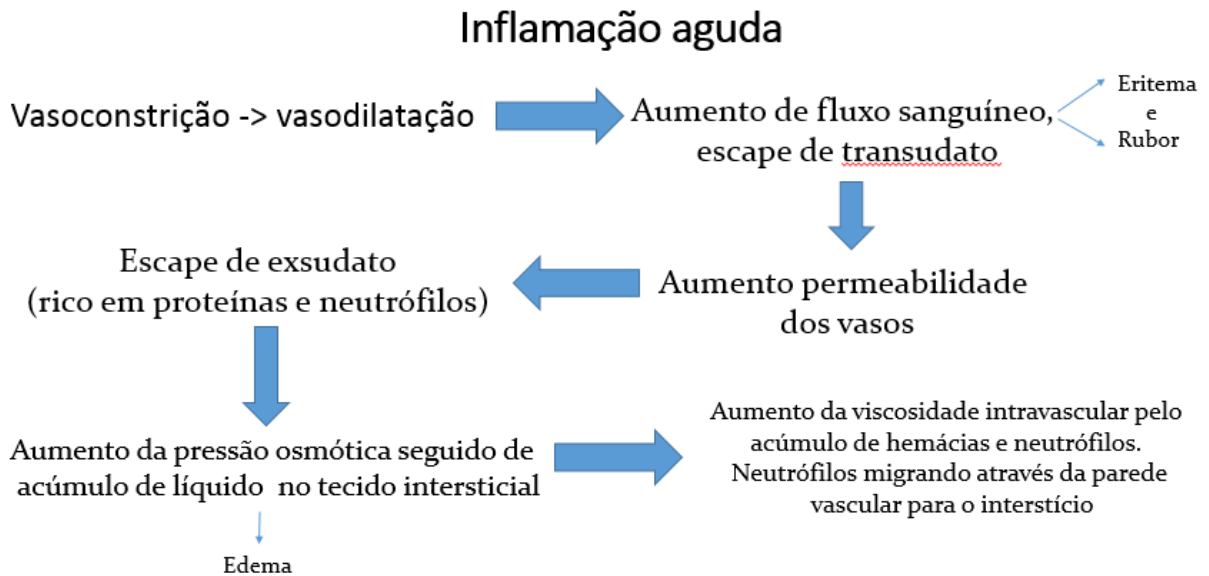


Figura 3. Sequencia geral de acontecimentos característicos da inflamação aguda.

No processo de formação de exsudato, os leucócitos polimorfonucleares e mononucleares migram para o sítio extravascular, em resposta a um gradiente de mediadores inflamatórios, num processo conhecido como quimiotaxia (FLOREY, 1970). Na maioria dos processos inflamatórios, os primeiros leucócitos a migrarem são os neutrófilos, sendo predominantes no infiltrado inflamatório nas primeiras 48 horas (COTRAN *et al.*, 1992; LOMONTE *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

A inflamação local é uma das principais consequências do envenenamento por *Bothrops*, podendo chegar à perda do membro afetado (PEREIRA, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2009) dependendo da extensão da lesão e rapidez no tratamento. Na literatura é possível encontrar numerosos trabalhos que mostram a capacidade dos venenos botrópicos de induzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios (OLIVO *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2009; ZAMMUNER, 2001). MOREIRA *et al.* (2007) observaram que inoculação intraperitoneal de veneno de *Bothrops jararaca* induziu liberação PGE₂, mediador de vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular, promovendo indução de edema por extravasamento de fluido e migração de leucócitos. FARSKY *et al.* (2000) também indica a capacidade do veneno de *Bothrops asper* de ativar frações C5 do sistema complemento, que por sua vez agem no recrutamento de neutrófilos.

Vários estudos apontam a indução de migração de neutrófilos por veneno de espécies de *Bothrops* (ELIFIO-ESPOSITO *et al.*, 2011; PATRÃO-NETO *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2009; ZAMUNER *et al.*, 2001). E embora neutrófilos representem a primeira linha de defesa

contra infecções, liberando enzimas capazes de destruir tanto micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos realizando fagocitose (BUTTERFIELD *et al.*, 2006; LOMONTE *et al.*, 1993; SEGEL *et al.*, 2011), quando a inflamação não é causada por micro-organismos, o acúmulo de neutrófilos pode causar danos ao tecido circundante (SEGEL *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm associado o acúmulo de neutrófilos a um agravamento no dano tecidual em envenenamentos botrópicos (BUTTERFIELD *et al.*, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2008; DAVIES, 2011; PATRÃO-NETO *et al.*, 2013; SEGEL *et al.*, 2011; ZAMUNER *et al.*, 2001) geralmente devido às enzimas secretadas por estes. TEIXEIRA *et al.* (2009), com base em estudos anteriores (CHAVES *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2003), afirma que apesar dessa relação, a ausência de neutrófilos não reduziu o nível de mionecrose, ao invés disso, reduziu a regeneração muscular esquelética, categorizando neutrófilos como peças fundamentais na recuperação do tecido. Em resposta, PATRÃO-NETO *et al.* (2013) reafirma com os dados de seu trabalho e com base em literatura prévia que a infiltração de neutrófilos está envolvida na lesão de tecidos. Ao que tudo indica os mecanismos de ação e substâncias secretadas por neutrófilos, no quadro de envenenamento ofídico, se encaixa em um grupo de casos específicos, assim como os discutidos por SEGEL *et al.* (2011), onde sua ação é mais prejudicial do que benéfica.

O processo edematogênico é desencadeado por fenômenos multifatoriais, sendo que fatores hemorrágicos possuem papel importante (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989). A formação do edema, no entanto, não é consequência exclusiva da ação de uma proteína isolada do veneno botrópico, mas sim da somatória de efeitos de várias toxinas presentes nesses venenos (SOUZA, 2010) com as proteínas presentes no organismo envenenado.

Os principais componentes envolvidos na inflamação causada pelo envenenamento botrópico são as metaloproteases (COSTA *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2009) e as PLA₂ (GUTIÉRREZ e LOMONTE 1997; GUTIÉRREZ *et al.*, 1991; IGLESIAS, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2009) com uma participação em menor grau das serinoproteases (Figura 3).

As respostas mionecrótica e inflamatória são fundamentais para causar as disfunções características do quadro (GUTIERREZ *et al.*, 1986; TEIXEIRA *et al.*, 2009). A inflamação no envenenamento botrópico frequentemente evolui para isquemia e compressão neural, levando a perdas permanentes de tecido e, em alguns casos, amputação (JORGE *et al.*, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 2009) e vários autores afirmam esta inflamação apresenta uma contribuição importante para o desenvolvimento do dano muscular (CARNEIRO *et al.*, 2008; DAVIES, 2011;

GUTIERREZ *et al.*, 1986; PATRÃO-NETO *et al.*, 2013; SEGEL *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2009; ZAMUNER *et al.*, 2001).

1.6 Tratamento do Envenamento Botrópico

O único tratamento cientificamente válido para os envenenamentos ofídicos é a administração parenteral de antivenenos produzidos em cavalos e ovelhas (GUTIERREZ *et al.*, 2007; WARREL, 1996). Estes antivenenos, também chamados de soros antiofídicos, são bastante eficazes na neutralização dos efeitos sistêmicos induzidos pelas peçonhas, porém a neutralização dos efeitos locais somente é atingida parcialmente, tanto com soros polivalentes quanto específicos (da SILVA *et al.*, 2007; GUTIERREZ *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2009), agravado principalmente pela velocidade com que estes efeitos são desencadeados e, em muitos casos, pela demora na administração do soro antiofídico (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989). Mesmo quando o paciente é tratado com soro de forma efetiva, ou imediatamente após a picada, o que reduz drasticamente a letalidade (SAÉZ e SOTO, 2009) com uma eficácia entre 70% e 80% (de PAULA, 2009), os efeitos sistêmicos são neutralizados, mas os locais não são revertidos, existindo uma possibilidade real do surgimento de sequelas (ANAI *et al.*, 2002). Um outro inconveniente da administração do soro é a frequência com que ocorrem reações alérgicas contra sua aplicação, chegando não raramente a choque anafilático, em casos mais graves (de PAULA, 2009; PATRÃO-NETO *et al.*, 2013), por este motivo, há indicação da administração concomitante de anti-histamínicos.

Além de não combater efetivamente os efeitos locais do veneno, o soro antiofídico precisa ser armazenado em condições especiais, em geladeira, e ainda há dificuldade de distribuição em regiões de difícil acesso no país (de PAULA, 2009; SAÉZ e SOTO, 2009). Nessas regiões onde a capacidade hospitalar e farmacológica é precária, a medicina popular de uso de plantas tem apresentado uma grande importância contra as picadas de serpentes, tanto com finalidade de neutralizar o veneno quanto aliviar os sintomas (SAÉZ e SOTO, 2009).

1.6.1 Plantas com atividade anti-ofídica

A propriedade de combater efeito de venenos é chamada de alexiteria, e embora o termo não seja muito difundido na literatura sobre o assunto, é possível encontrar um crescente número de trabalhos que se referem plantas alexitéricas como aquelas usadas para combater

picadas de animais peçonhentos e as alexiviperinas para aquelas que são eficazes contra picadas de serpentes especificamente (ATHER, 2013; BANU *et al.*, 2009; CAMARGO *et al.*, 2011; SAÉZ e SOTO, 2009; WANI *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2014). Pelo menos 800 espécies vegetais são usadas para combater picadas de serpentes no mundo, sendo a maior parte dessas (7%), pertencentes às famílias Leguminosae e Compositae (Martz, 1992; MENDES *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2008; MORS *et al.*, 2000; PHILLIPSON e ANDERSON, 1989; SAÉZ e SOTO, 2009; SOARES *et al.*, 2005; VALE *et al.*, 2008).

Embora a reputação antiofídica seja geralmente causada por superstição ou propriedades não comprovadas cientificamente. Avaliando 50 extratos de 48 espécies de vegetais, CASTRO *et al.* (1999) observaram que pelo menos 18 apresentaram propriedade alexiviperina. Graças ao acervo etnobotânico oriundo da medicina popular, várias plantas foram identificadas (e em alguns casos seus metabolitos isolados) e obtiveram comprovação de eficácia contra algumas ações dos venenos (BORGES *et al.*, 2000; MAIORANO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SÁEZ e SOTO, 2009; SOARES *et al.*, 2004; SAMY *et al.*, 2008).

Os produtos naturais com características bioativas que mais se destacam por sua importância terapêutica são aqueles derivados do chamado “metabolismo secundário” vegetal, como os alcalóides, flavonóides, taninos, cumarinas e terpenos (HABERMEHL, 1998; MANCINE, 1996; SIMÕES *et al.*, 2004; YAMADA, 1998). Dentre os metabolitos secundários isolados de plantas com comprovada ação alexiviperina (capacidade de inibir especificamente veneno de serpentes), destacam-se os polifenóis, capazes de inibir a ação miotóxica e edematogênica de veneno de *Bothrops jararacussu*, taninos, que possuem capacidade de formar complexos com as proteínas dos venenos ofídicos e alguns alcalóides que apresentam atividade anti-inflamatória (Ver MORS *et al.*, 2000; REYES e JIMÉNEZ, 1995; SAÉZ e SOTO, 2009). Tem-se descrito uma série de atividades farmacológicas dos flavonóides, tais como inibição da atividade plaquetária, atividade antitrombótica (CHUNG *et al.*, 1993), atividade anti-inflamatória e capacidade de inibir a enzima fosfolipase A₂ (GIL *et al.*, 1997).

CARVALHO *et al.* (2013) afirmam que os compostos polifenólicos (flavonoides, alcaloides, esteroides e terpenos e polifenóis) são os principais inibidores das PLA₂. Devido a sua capacidade de precipitar proteínas e formar complexos com metais como o Ca²⁺ e Zn²⁺, conseguem promover a diminuição da atividade da PLA₂ e metaloproteases, respectivamente (IGLESIAS *et al.*, 2005; MCDONALD *et al.*, 1996; PATIÑO *et al.*, 2012). As metaloproteases dependentes de zinco, presentes no veneno de *Bothrops* (BORKOW *et al.*, 1997; GUTIÉRREZ

et al., 1995), são algumas das responsáveis pela atividade hemorrágica observada no envenenamento (BJARNASON e Fox, 1994).

Flavonoides, que apresentam capacidade de quelar íons metálicos (CASTRO *et al.*, 1999; DOBBIN e HIDER, 1990), exercem seu efeito inibitório sobre a PLA₂ a través de interações hidrofóbicas com aminoácidos residuais aromáticos ou hidrofóbicos desta proteína (TICLI *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2005). Também não se deve descartar totalmente a possibilidade da ação dos taninos neste mecanismo, sendo derivados da catequina e epicatequina, poderiam também interferir nos níveis de zinco (CASTRO *et al.*, 1999).

SAÉS e SOTO (2009) apresentam uma extensa lista de plantas potencialmente alexiviperinas, porém sem efeitos comprovados cientificamente, com *Capsicum annuum* sendo uma dessas espécies utilizadas no Brasil. Até o momento, sabe-se que *Capsicum frutescens* é capaz de inibir o efeito hemorrágico do veneno de *Bothrops atrox* (OTERO *et al.*, 2000). Mas já foi comprovado que extratos de espécies de *Capsicum* possuem atividades anti-inflamatórias na migração de leucócitos e edema de pata (HERNÁNDEZ-ORTEGA *et al.*, 2012; JANG *et al.*, 2011; JOLAYEMI e OJEWOLE, 2013; SPILLER *et al.*, 2008; ZIMMER *et al.*, 2012). *Capsicum chinense*, também apresentou diversas propriedades anti-inflamatórias no trabalho de LEAL (2012).

1.7 *Capsicum chinense*

Capsicum chinense é considerada por REIFSCHNEIDER (2000) a mais brasileira das pimentas domesticadas, encontrada em grande diversidade na bacia Amazônica e no Pará, apresentando diferentes cultivares ou variedades. As variedades de *Capsicum chinense* se diferenciam pelo tamanho, cor, forma das folhas, flores, os frutos e a intensidade da atividade picante. Entretanto, os frutos são a parte mais variável entre as cultivares ou variedades (Figura 4), com numerosas sementes presas a placenta central, local do princípio ativo picante (LORENZI *et al.* 2008). A espécie é composta por plantas com 45 a 76 cm de altura, folhas ovadas, largas, macias ou rugosas, de tonalidade verde claro a escuro. As flores aparecem de 3 a 5 por nó e os frutos variam de 1,0 a 12,0 cm de comprimento, com formas variáveis e de cores salmão, laranja, amarela, vermelha ou marrom (SMITH e HEISER, 1957 *apud* LORENZI *et al.* 2008).



Figura 4. Variedades de *Capsicum chinense*. (a) Variedade biquinho; (b) Variedade Bode amarela; (c) Variedade Bode vermelha.

Fonte: (a):<http://www.cpt.com.br/cursos-agroindustria>

(b) e (c):<http://gastronomiamineiracomcheffsilva.blogspot.com.br>

Algumas variedades da espécie *Capsicum chinense* são a pimenta biquinho que apresenta pungência doce e com aroma forte e é utilizada em saladas, conservas. A outra variedade, a pimenta bode, ao contrário, é de pungência forte, usada em condimentos no preparo de carnes, arroz, feijão, pamonha salgada e biscoitos e principalmente em conservas. Essa apresenta duas variedades, pimenta bode amarela e vermelha, ambas maduras, utilizadas em conservas (REIFSCHNEIDER 2000).

Apesar do largamente difundido uso condimentar, alguns autores sugerem que o emprego medicinal pode ter sido o responsável pelo processo de domesticação das espécies de *Capsicum* (BOSLAND e VOTAVA, 2000; DEWITT e BOSLAND, 1996). Existe na literatura registros de que os povos ameríndios as utilizavam terapeuticamente em busca de atividade antiblenorrágica (CASTIGLIONI, 1947), para combater queimaduras, resfriados e dores de garganta (CICHEWICZ e THORPE, 1996; BOSLAND e VOTAVA, 2000), cólicas menstruais (PEREIRA *et al.*, 2007), doenças respiratórias, oftalmias, malária (MILIKEN e ALBERT, 1997; MILIKEN *et al.*, 1999) e inclusive acidentes ofídicos (OTERO *et al.*, 2000).

Estudos revelam que a capsaicina, responsável pela pungência apresentada por estas pimentas, exibe propriedades anti-inflamatórias inibindo o desenvolvimento da inflamação induzido por carragenina no modelo de edema de pata em camundongos e também no modelo de artrite em ratos, embora a liberação de mediadores pró-inflamatórios esteja associada com a propriedade anti-inflamatória da capsaicina (KIM *et al.* 2003).

LEAL (2012) avaliou propriedades farmacológicas de extratos brutos de duas variedades de *Capsicum chinense* e corroborou as propriedades anti-inflamatória do extrato tanto no teste de migração de neutrófilos quanto na evolução do edema de pata, identificando

também propriedades analgésicas para o extrato hexânico da variedade bode, embora este extrato não tenha apresentado propriedades antinociceptivas.

Na composição das espécies do gênero *Capsicum*, já foram encontrados capsaicinóides, responsável pela ação picante das pimentas, os carotenóides, ácidoascórbico, vitaminas C, vitamina E, vitaminas do complexo B e compostos fenólicos (REIFSCHNEIDER 2000), ácidos graxos, alfa caroteno, violaxantina, flavonoides, dentre outros (LORENZI *et al.* 2008). Com isto se tornam espécies interessantes para avaliação da sua capacidade alexiviperina.

2 OBJETIVOS

Verificar a ação alexiviperina da fração hexânica do extrato de *Capsicum chinense* var. biquinho nas atividades biológicas do veneno de *Bothropoides matogrossensis*.

2.1 Objetivos específicos

Obtenção do extrato bruto hexânico a partir de frutos maduros de *Capsicum chinense*.

Obtenção da curva dose-resposta do veneno de *Bothrops matogrossensis* para migração de neutrófilos em camundongos Swiss e C-57 Black

Identificar a dose mínima de extrato hexânico de *Capsicum chinense* com ação de inibição sobre a migração de neutrófilos induzida por veneno de *Bothrops matogrossensis*.

Avaliar ação inibitória do extrato de *C. chinense* sobre a migração de neutrófilos da reação de inflamação induzida pelo veneno de *B. matogrossensis*.

Analisar atividade antiedematogênica dos extratos de *C. chinense* sobre inflamação induzida por veneno de *B. matogrossensis*.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-SANTOS, S., AND M. SALOMÃO. 2002. Reproduction in neotropical pit vipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In SCHUETT, G.W.; HÖGGREN, M.;

GREENE, H.W. (eds.), **Biology of the Vipers**, pp. 445–462. Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, UT, 2002.

AMARAL, C.F.S.; SILVA, O.A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon**, 2, 877-85, 1985.

ANAI, K; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, n. 1, p. 63-68, 2002.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A2—a structural review. **Toxicon**, vol. 34, no. 8, pp. 827–841, 1996.

ATHER, V., CHATTOPADHYAY, P., GOVARY, D. AND VEER, V. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of the alkaloid punarnavine from *Boerhaavia diffusa*. **Planta Medica**, 79 (11): 939-945, 2013.

BANU, G. S., KUMAR, G. AND MURUGESAN, A. G. Effect of ethanolic leaf extract of *Trianthema portulacastrum* L. on aflatoxin induced hepatic damage in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. 24 (4): 414-418, 2009.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos: Revisão. **JBN**, São Paulo, v 65, 209-250, 1993.

BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta Médica da Bahia** 81(1):60-69, 2011.

BÉRNILS, R. S. E H. C. COSTA (org.). Répteis brasileiros: Lista de espécies. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Versão 2012.2. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acessada em 20/01/2014.

BJNARSON, J. W.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **Pharmacol. Therapeutics**. v. 62, p.325-372, 1994.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. 1. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. *Methods in Enzymology*, 248 p.345-368, 1995.

BOCHNER, R. **Acidentes por animais peçonhentos: aspectos históricos, epidemiológicos, ambientais e sócio-econômicos**. 2003. 153p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Formação Científica e Tecnológica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

BOCHNER, R. & STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cadernos de Saúde Pública**, 18:735- 746, 2002.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTEIRO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia silvestres* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 127, 21-31, 2000.

BORKOW, G., J.M. GUTIÉRREZ & OVADIA, M. Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. **Toxicon** 35: 865-877, 1997.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. Peppers: vegetable and spice Capsicums. Wallingford: **CABI Publishing**. (Crops Production Science in Horticulture, 22). 224 p. 2000.

BRAUD, S.; BOM, C.; WISNER. A snake venom proteins acting on homeostasis. **Biochimie**. 82, p851-859, 2000

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Acidentes por animais peçonhentos. Aspectos epidemiológicos. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31500. Acesso em 10/02/2014.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ofídico. III. Tratamento das mordeduras das cobras. **Rev. Med.** São Paulo 4:371-380, 1901.

BUTTERFIELD, T.A.; BEST, T.M.; MERRICK, M.A. The dual roles of neutrophil and macrophages in inflammation: A critical balance between tissue damage and repair. **Journal of Athletic Training** vol 41 (4) 47-465, 2006.

CAMARGO, F., TORRES, A.M., RICCIARDI, G., RICCIARDI, A. AND DELLACASSA, E. SDS-PAGE: una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexítera de extractos vegetales. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. 10 (5): 429-434, 2011.

CAMPBELL, J.A., LAMAR, W.W. The venomous reptiles of Latin America. **Ithaca, Cornell Univ. Press**. 1989.

CARNEIRO, A.S.; RIBEIRO, O.G.; CABRERA, W.H., VORRARO, F.F.M.; IBANEZ, O.M.; STAROBINAS, N. *Bothrops jararaca* venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. **Toxicon** 52, 619–627, 2008.

CARRASCO, P.A.; MATTONI, L.I.; LEYNAUD, G.C. e SCROCCHI, G.J. Morphology, Phylogeny and taxonomy of South american bothropoid pit-vipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica scripta**, 41: 109-124, 2012.

CARVALHO, B.M.A.; SANTOS, J.D.L.; XAVIER, B.M.; ALMEIDA, J.R.; RESENDE, L.M.; MARTINS, W. MARCUSSI, S.; MARANGONI, S.; STÁBELI, R.G.; CALDERON, L.A.; SOARES, A.M.; DA SILVA, S.L.; MARCHI-SALVADOR, D.P. 2013. Snake Venom PLA2s Inhibitors Isolated from Brazilian Plants: Synthetic and Natural Molecules. **BioMed Research International**, vol. 2013, 8 p., 2013.

CASTRO, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; BARRIOS, M.; CASTRO, I.; ROMERO, M.; UMAÑA, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. **Revista de Biología Tropical**, v. 47, 605-616, 1999.

CHAVES, F., TEIXEIRA, C.F., GUTIÉRREZ, J.M. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. **Inflammation Research** 55, 245–253, 2006.

CHIPPAUX, J.P. Morsures et envenimations ophidiennes. **Revue Française des Laboratories**, 342 p55-60, 2002.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V. E WHITE J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, 29 p1279-1303, 1991.

CHUNG, M.I., K.H. GAN, C.N. LIN, F. N. KO & TENG, C.M. Antiplatelet effects and vasorelaxing action of some constituents of Formosan plants. **J. Nat. Prod.** 56: 929-934, 1993.

CICHEWICZ, R. H.; THORPE, P. A. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 52, p. 61-70, 1996.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Pathologic Basis of Disease**, 6 ed. Philadelphia: Saunders, 50-87, 1999.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia Básica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 21-39, 1992.

DAVIES, M.J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **Journal of Clinical Biochemistry Nutrition** 48, 8–19, 2011.

DEWITT, D.; BOSLAND, P. W. Peppers of the world: an identification guide. Berkeley: **Ten Speed**, 219 p. 1996.

De OLIVEIRA, E.C.; FERNANDES, C.P.; SANCHEZ, E.F.; ROCHA, L.; FULY, A.L. Inhibitory effect of plant *Manilkara subsericea* against biological activities of *Lachesis muta* snake venom. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/408068>

De PAULA, R.C. Efeito de Extratos vegetais sobre atividades biológicas do veneno da serpente *Lachesis muta*. 2009. 90p. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2009.

DOBBIN, P.S. & R.C. HIDER. 1990. Iron chelation therapy. **ChemistryBrazilian** 26: 565-568.

ELIFIO-ESPOSITO, S., TOMAZELI, L., SCHWARTZ, C., GIMENEZ, A.P., FUGII, G.M., FERNANDES, L.C., ZISHLER, L.F.M., STUELP-CAMPELO, P.M., MORENO, A.N. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, agalactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Immunology** 12, 2011.

FARSKY, S.H., GONÇALVES, L.R., GUTIÉRREZ, J.M., CORREA, A.P., RUCAVADO, A., GASQUE, P., TAMBOURGI, D.V. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. **Mediators Inflammation**. 9, 213–221, 2000.

FENWICK, A.M., GUTBERLET, R.L., EVANS, J.A., PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of south American pitvipers, genera *Bothrops*, *bothriopsis* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 156: 617-640, 2009.

FLOREY, H.W. Inflammation. In: FLOREY, H.W. **General Pathology**, 4th ed. Philadelphia: Saunders, p. 1-174, 1970.

FRANCO, L. F. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos no Brasil**. São Paulo, Editora Sarvier, p. 13-32, 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. Brasília: Funasa, 2001.

FURTADO, M.F.D.; COLLETO, G.M.D.D.; DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondents antivenenos. **Memorias do Instituto Butantan**. 53, p149-159, 1991.

GIL, B.; SANZ, M.J.; TERCENCIO, M.C.; GUNASEGARAN, R.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M.J. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A2 with antiinflammatory activity. **Biochemical Pharmacology** 53: 733-740, 1997.

GRANTS AU, R. As cobras venenosas do Brasil. São Bernardo do Campo (SP): **Bandeirante**, 192p. 1928.

GREENE, H.W. Snakes: the evolution of mystery in nature. 1. ed. Berkeley: **University of California Press**, 351 p. 2000.

GUTIERREZ, J.M., CHAVES, F., CERDAS, L. Inflammatory infiltrate inskeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Revista Biologia Tropical** 34, 209–214, 1986.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. **Memórias do Instituto Butantan** 51: 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 33, 1405–1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M., M. ROMERO, C. DÍAZ, G. BORKOW & M. OVADIA. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon** 33: 19-29, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M. Understanding snake venoms: 50 years of research in Latin America. **Revista de Biología Tropical**. 50, p377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBT, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systems myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A; ESCARLANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1077, 2005.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 13, no. 28, pp. 2935–2950, 2007.

GUTIÉRREZ, J.M.; FAN, H.W.; SILVERA, C.L.M.; ANGULO, Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop. **Toxicon**, vol. 53, no. 6, pp. 625–630, 2009.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. **Biologicals**, vol. 39, no. 3, pp. 129–142, 2011.

GUTIERREZ, J.M., 2012. Improving antivenom availability and accessibility: science, technology, and beyond. **Toxicon** 60, 676–687, 2012

HABERMEHL, G.G. Secondary and tertiary metabolites as plant toxins. **Toxicon**, v.36, 1707-1719, 1998.

HARVEY, A.L. **Snake Toxins**. New York. Pergamon, 1991.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K.K. Snake venom hemorrhagins. **Critical Reviews in Toxicology**, 29, p1-19, 1999.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, M.; ORTIZ-MORENO, A.; HERNANDÉZ-NAVARRO, M.D.; CHAMORRO-CEVALLOS, G.; DORANTES ALVAREZ, L.; NECOECHEA-MONDRAGÓN, H. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids

extracted from dried pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012, Article ID 524019, 10p. 2012

IGLESIAS CV, APARICIO R, RODRIGUES-SIMIONI L, CAMARGO EA, ANTUNES E, MARANGONI S, TOYAMA, D.O.; BERIAM, L.O.S.; MONTEIRO, H.S.A.; TOYAMA, M.H. Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA2). **Toxicon**, 46:751-8, 2005.

JANG, H. Y.; KIM, S. M.; YUK, J. E.; KWON, O. K.; OH, S. R.; LEE, H. K.; JEONG, H.; AHN, K. S. *Capsicum annuum* L. methanolic extract inhibits ovalbumin-induced airway inflammation and oxidative stress in a mouse model of asthma. **Journal of Medicinal Food**, 14, 1144-1151, 2011.

JOLAYEMI, A.T. and OJEWOLE, J.A.O. Comparative anti-inflammatory properties of Capsaicin and ethyl-aActate extract of *Capsicum frutescens* linn [Solanaceae] in rats. **African Health Sciences** 13(2): 357-361, 2013.

KIM, C. S.; KAWADA, T.; KIM, B. S.; HAN, I. S.; CHOE, S. Y.; KURATA, T.; YU, R. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. **Cellular Signalling**, 15, 299-306, 2003.

KOH, D.C.I.; ARMUGAM, A.; AND JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 63, no. 24, pp. 3030–3041, 2006.

LEAL, A.P.F. **Avaliação das propriedades farmacológicas dos extratos brutos de duas variedades de *Capsicum chinense* Jacq.** 2012. 64p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2008.

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

MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.F.; OLIVEIRA, C.Z.; COUTO, L.B.; GOME, O.A.; FRANÇA, D.C.; SOARES, A.M.; PEREIRA, P.S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, 364-370, 2005.

MANCINE, B. Obtenção de princípios ativos vegetais. **Revista Racine**, v. 6, 54-55, 1996.

MARTINS, M.; MARQUES, O.A.V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: SCHEUTT, G.W.; HÖGGREN, M.; GREENE, H.W. **Biology of the Vipers**, pp. 307-328. Eagle Mountain Publishing, UT, 2002.

MARTZ, W. Plant with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v.30, 1131-1142, 1992.

MCDONALD M, MILA I, SCALBERT A. Precipitation of metal ions by plant polyphenols: Optimal conditions and origin of precipitation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44:599-606, 1996.

MELGAREJO, A. R. SERPENTES PEÇONHENTAS DO BRASIL. IN: CARDOSO, J.L.C, FRANÇA, F.O. DE S., WEN, F.H., MALAQUE, C.M.S.A., HADDAD-JR, VIDAL. **Animais Peçonhentos do Brasil. Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. Savier, São Paulo, p33-61, 2003.

MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S. Anti-snake venom properties of *Shizolobium parahyba*(Casealpinaceae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 859-866, 2008.

MENDES, M. M.; VALE, L.H. F; IZIDORO, L. F. M.; LUCENA, M. N.; OLIVEIRA JUNIOR, R. O.; VIEIRA, S. A. P. B.; SOARES, A. M.; ALCÂNTARA, T. M.; HOMSI-

BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; RODRIGUES, V. M. Acute toxicity of *Schizolobium parahyba* aqueous extract in mice. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 459-462, 2010.

MILLIKEN, W.; ALBERT, B. The use of medicinal plants by the Yanomami Indians of Brazil, Part II. **Economic Botany**, New York, v. 51, n. 3, p. 264-278, 1997.

MILLIKEN, W.; ALBERT, B.; GOODWIN GOMEZ, G. Yanomami: a forest people. Kew: **Royal Botanic Gardens**, 161 p. 1999.

MIRTSCHIN, P. J., SHINE, R., NIAS, T. J., DUNSTAN, N. L., HOUG, B. J., MIRTSCHIN, M. Influences on venom yield in Australian tigersnakes (*Notechis scutatus*) and brownsnakes (*Pseudonaja textilis*: Elapidae, Serpentes). **Toxicon**, v. 40, p. 1581-1892, 2002.

MONTEIRO, C.; MONTGOMERY, C.E.; SPINA, F.; SAWAYA, R.J.; MARTINS, M. Feeding, reproduction, and morphology of *Bothrops matogrossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. **Journal of Herpetology**, v. 40, 408-413, 2006.

MOREIRA V, ZAMUNER SR, WALLACE JL, TEIXEIRA CDE F. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissusterrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E2 and D2, and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, 49(5):615–24, 2007.

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

MURAKAMI, M., SHIMBARA, S., KAMBE, T., KUWATA, H., WINSTEAD, M.V., TISHFIELD, J.A., KUDO, I. The functions of five distinct mammalian phospholipase A2s in regulating arachidonic acid release. **Journal of Biological Chemistry**. 273 (23), 14411–14423, 1998.

OLIVEIRA, C.Z.; MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; JANUÁRIO, A.H. LOURENÇO, M.V.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M.

Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia fortificata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98 213-216, 2005.

OLIVEIRA, A.K. **Análise dos elementos estruturais de metaloproteases das classes P-I e P-III do veneno de *Bothrops jararaca* importantes para suas interações com proteínas plasmáticas e da matriz extracelular**. 2009. 130p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

OLIVO, R.A., TEIXEIRA, C.F., WALLACE, J.L., GUTIERREZ, J.M., ZAMUNER, S.R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon** 49, 670–677, 2007.

OMS – Organização Mundial da Saúde: Neglected tropical diseases: Snakebite. http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf?ua=1. Acessado em: 10/03/2014.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the hemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 73, p. 233-241, 2000.

OWNBY, C.L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: SHIER, W.T.; MEBS, D. **Handbook of Toxicology**. New York: Marcel Dekker, 601-654. 1990.

PATÍÑO, A.C.; LOPEZ, J.; ARISTIZÁBAL, M.; QUINTANA, J.C.; BENJUMEA, D. 2012. Efecto inibitório de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). **Biomédica**, 32: 365-374, 2012.

PATÍÑO, A.C.; BENJUMEA, D.M.; PEREAÑEZ, J.A. Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) extract: Comparison of wild and in vitro propagated plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, 590-596, 2013.

PATRÃO-NETO, F.C.; TOMAZ, M.A.; STRAUCH, M.A.; MONTEIRO-MACHADO, M.; ROCHA-JUNIOR, J.R.; BORGES, P.A.; CALIL-ELIAS, S.; MELO, P.A. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, vol. 69 55-64, 2013.

PEREIRA, I.C. **Atividade antiinflamatória da planta *Blutaparon portulacoides* sobre a reação inflamatória induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e por duas toxinas isoladas deste veneno**. 2009. 71p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Universidade do Vale do Paraíba. 2009.

PEREIRA, L. A.; SILVA, R. B. L.; GUIMARÃES, E. F.; ALMEIDA, M. Z.; MONTEIRO, E. C. Q.; SOBRINHO, F. A. P. Plantas medicinais de uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental: aspectos utilitários de espécies das famílias Piperaceae e Solanaceae. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 1385-1388, 2007.

PHILLIPSON, J.D.; ANDERSON, L.A. Ethnopharmacology and Western medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 25, 61-72, 1989.

RAMOS, O.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 142, p. 328-346, 2006.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. *Capsicum*: pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: **Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças**, 2000.

REYES, R. E JIMÉNEZ, M. Química de las plantas alexitéricas. **Interciencia**, 20 p257-263, 1995.

RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, 153-163, 2007.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America, p. 345-384. In W. Bucherl & E. Buckley (eds.). **Venomous Animals and Their Venoms**. Academic Press, Nueva York, 1971.

SAÉS, J.A. E SOTO, J. P. Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. **Medicina Naturista**, v. 3 p. 17-24, 2009.

SAMY, R.P.; THWIN, M.M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. E IGNACIMUTHU, S. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in southern part of Tamilnadu, **India. Journal of Ethnopharmacology**, 115 p 302-312, 2008.

SARAVIA-OTTEN, P., FRISAN, T., THELESTAM, M., GUTIÉRREZ, J.M. Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snakevenom: novel roles for venom proteinases. **Toxicon** 44, 749–764, 2004

SEGEL, G.B.; HALTERMAN, M.W.; LICHTMAN, M. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. **Journal of Leukocyte Biology** vol. 89 no. 3 359-372, 2011

SERRANO, S.M.; MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: Sequence Homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon** 45, 1115–1132, 2005.

SERRANO, S.M.; WANG, D.; SHANNON, J.D.; PINTO, A.F.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R.K.; FOX, J.W. Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. **FEBS Journal**, v274, p.3611-3621, 2007.

SHINE, R. Sexual dimorphism in snakes. In SEIGEL, R.A AND COLLINS, J.T. **Snakes: Ecology and Behavior**, (eds.). McGraw-Hill, Inc. New York, 1993.

SILVA, V. X. The *Bothrops neuwiedi* Complex. In J.A. Campbell and W. W. Lamar. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**, pp. 410-422. Cornell University Press, Ithaca, NY, 2004.

SILVA, V.X. AND RODRIGUES, M.T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa** 7: 45-90, 2008.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre, Florianópolis. Editora da UFSC, p.1102, 2004.

SOARES, A.M.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO, M.V.; PEREIRA, A.M.S.; PEREIRA, P.S. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs Future**, Barcelona, 29, 1105-1117, 2004.

SOARES, A.M.; TICLI, F.K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P.S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry** 12, 2625–2641, 2005.

SOUZA, L.G. **Efeito da fototerapia na reação inflamatória induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu* e por duas miotoxinas isoladas desse veneno**. 2010, 82p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale da Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, 2010.

SPILLER, F.; ALVES, M.K.; VIEIRA, S.M.; CARVALHO, T.A.; LEITE, C.E.; LUNARDELLI, A.; POLONI, J.A.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, J.R. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 60: 473-478, 2008.

STEWART C. J. Snake bite in Australia: first aid and envenomation management. **Accident and Emergency Nursing**. 11:106-111, 2003.

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

TEIXEIRA C.F.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; CRUZ-HOFLING, M.A.; FERNANDES, I.; CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J.M. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. **Muscle Nerve** 28:449–459. 2003

TICLI, F.K.; HAGE, L.I.S.; CAMBRAIA R.S.; PEREIRA, P.S.; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.M.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, vol. 46, no. 3, pp. 318–327, 2005.

TRIBUIANI, N.; da SILVA, A.M.; FERRAZ, M.C.; SILVA, M.G.; BENTES, A.P.G.; GRAZIANO, T.S.; SANTOS, M.G.; COGO, J.C.; VARANDA, E.A.; GROPPA, F.C.; COGO, K.; OSHIMA-FRANCO, Y. *Vellozia flavicans* Mart. Ex Schult. Hydroalcoholic extract inhibits the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, vol. 14 (1) 48, 2014

TU, A. T. Venoms: Chemistry and Molecular Biology. **John Wiley & Sons**, New York, 560 pp, 1977.

VALE, L.H.F.; MENDES, M.M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. **Basic Clinical Pharmacological Toxicological**, v. 103, p. 104-107, 2008.

WALLACH, V.; KENNETH L. WILLIAMS, J.B. **Snakes of the World: A Catalogue of Living and Extinct Species**. **Taylor and Francis**, CRC Press, 1237 pp. 2014.

WANI, T.Q., KUMAR, D., PRASAD, R., VERMA, P.K., SARDAR, K.K., TANDAN, S.K. AND KUMAR, D. Analgesic activity of the ethanolic extract of *Shorea robusta* resin in experimental animals. **Indian Journal of Pharmacology**, 44 (4): 493-499, 2012.

WARRELL, D.A. Clinical features of envenoming from snake bites, p. 64-76. In **C. Bon & M. Goyffon (eds.). Envenomings and Their Treatments**. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, 1996

WARRELL, D.A. Snake bites 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**. Comstock Publishing Associates, NY, USA, 709–761, 2004.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, 45: 951-967, 2005.

YADAV, K.N., KADAM, P.V., PATEL, J.A. AND PATIL, M.J. Strychnos potatorum: Phytochemical and pharmacological review. **Pharmacognosy review**. 8 (15): 61-66, 2014.

YAMADA, C.S.B. Fitoterapia, sua história e importância. **Revista Racine**, v.8, 50-51, 1998.

ZAMUNER, S.R., GUTIERREZ, J.M., MUSCARA, M.N., TEIXEIRA, S.A., TEIXEIRA, C.F. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon** 39, 1505–1513, 2001.

ZIMMER, A. R.; LEONARDI, B.; MIRON, D.; SCHAPOVAL, E.; OLIVEIRA, J. R.; GOSMANN, G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. **Journal Ethnopharmacology**, 139, 228-233, 2012.

ARTIGO: Efeito do extrato hexânico de *Capsicum chinense* Jacq. na inflamação induzida pelo veneno de *Bothrops matogrossensis*.

Resumo: A soroterapia é o único tratamento reconhecido para envenenamento ofídico. Mesmo quando administrado, o soro não reduz eficazmente os efeitos locais dos venenos. Envenenamento por *Bothrops matogrossensis* é caracterizado por reações locais como necrose e inflamação intensa, constituída pela formação de edema e migração leucocitária. Vários extratos de origem vegetal têm combatido eficazmente estes efeitos. *Capsicum chinense* apresenta compostos comumente atribuídos à inibição do veneno. Foi avaliada a capacidade do extrato hexânico de *Capsicum chinense* de inibir a formação de edema e migração de neutrófilos induzidas por veneno de *Bothrops matogrossensis*. Foi avaliada a influência na migração de neutrófilos das doses de 5, 10 e 15mg/kg do extrato após 6 h e 15mg/kg 12h após a inoculação de 30µg de veneno. Também foi avaliado o efeito de 15mg/kg de extrato sobre a formação de edema de pata nos intervalos de 15, 30, 60, 120 e 240 minutos após a inoculação de 30µg de veneno. Apenas a dosagem de 15mg/kg conseguiu reduzir significativamente a migração de neutrófilos com relação ao controle. As dosagens menores não apresentaram diferença com o controle. O extrato não conseguiu reduzir significativamente o edema de pata com relação ao controle positivo em nenhum dos intervalos analisados. Porém a dosagem de 15mg/kg conseguiu reduzir significativamente a migração com relação ao controle positivo para os intervalos de 6 e 12 horas pós inoculação. Portanto estes resultados demonstram que *Capsicum chinense* possui em sua composição substâncias capazes de inibir alguns efeitos do processo inflamatório induzido pelo veneno de *Bothrops matogrossensis*.

Palavras-chave: envenenamento, ofidismo, extratos vegetais, alexiteria.

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 90% dos acidentes ofídicos no Brasil são causados por jararacas (gênero *Bothrops*) (BARRAVIEIRA, 1993; FUNASA, 2001). O quadro clínico por envenenamento botrópico (Figura 2), é principalmente caracterizado, e identificado com relativa facilidade por intensas reações locais como hemorragia, mionecrose, equimose, inflamação (edema intenso e dor) (FRANCO, 2003; GUTIÉRREZ, 1995; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; ROSENFELD, 1971; TEIXEIRA *et al.*, 2009; TRIBUIANI *et al.*, 2014; WARREL, 2004), dentre os que a inflamação aguda (SOUZA, 2010) considerada a reação principal (ROSENFELD, 1971).

No início do processo inflamatório, rápidas mudanças na dilatação dos vasos aliadas a liberação de mediadores químicos promovem escape de líquido vascular rico em proteínas e leucócitos (exsudato) para o tecido intersticial, caracterizando o edema (COTRAN *et al.*, 1992; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Na maioria dos processos inflamatórios, os primeiros leucócitos a migrarem são os neutrófilos, sendo predominantes no infiltrado inflamatório nas primeiras 48 horas (COTRAN *et al.*, 1992; LOMONTE *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 2009). E embora neutrófilos liberem enzimas capazes de destruir tanto micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos e realizando fagocitose (BUTTERFIELD *et al.*, 2006; LOMONTE *et al.*, 1993; SEGEL *et al.*, 2011), quando a inflamação não é causada por micro-organismos, o acúmulo de neutrófilos pode causar danos ao tecido circundante (SEGEL *et al.*, 2011), como já tem sido observado em envenenamentos botrópicos (ZAMUNER *et al.*, 2001; BUTTERFIELD *et al.*, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2008; DAVIES, 2011; SEGEL *et al.*, 2011; PATRÃO-NETO *et al.*, 2013). Devido a isso, vários trabalhos afirmam que a inflamação apresenta uma contribuição importante para necrose característica do quadro (CARNEIRO *et al.*, 2008; DAVIES, 2011; GUTIERREZ *et al.*, 1986; PATRÃO-NETO *et al.*, 2013; SEGEL *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2009; ZAMUNER *et al.*, 2001).

Os principais componentes do veneno botrópico são metaloproteases, fosfolipases A₂ e serinoproteases (GUTIÉRREZ, 2002; SOARES *et al.*, 2004), sendo os dois primeiros os principais envolvidos na inflamação (COSTA *et al.*, 2002; GUTIÉRREZ *et al.*, 1991; GUTIÉRREZ e LOMONTE 1997; IGLESIAS, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2009). A atividade das PLA₂ e metaloproteases são dependentes dos íons Ca²⁺ e Zn²⁺, respectivamente (IGLESIAS *et al.*, 2005; MCDONALD *et al.*, 1996; PATIÑO *et al.*, 2012).

O único tratamento cientificamente válido para os envenenamentos ofídicos é a administração antivenenos (soro) (GUTIERREZ *et al.*, 2007; WARREL, 1996). O soro é

bastante eficaz contra efeitos sistêmicos de venenos, porém não é efetivo contra os efeitos locais (GUTIERREZ *et al.*, 2007; da SILVA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Além de frequentemente ocorrerem reações alérgicas, chegando não raramente a choque anafilático (de PAULA, 2009; PATRÃO-NETO *et al.*, 2013). Essa ineficiência aliada à dificuldade de distribuição em regiões de difícil acesso no país a medicina popular de uso de plantas tem apresentado uma grande importância contra as picadas de serpentes, tanto com finalidade de neutralizar o veneno quanto aliviar os sintomas (SAÉZ e SOTO, 2009).

Nas últimas décadas vários estudos têm comprovado eficiência de extratos vegetais e metabólitos isolados em combater algumas das ações dos venenos (CASTRO *et al.*, 1999; BORGES *et al.*, 2000; MAIORANO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PATRÃO-NETO *et al.*, 2013; SÁEZ e SOTO, 2009; SAMY *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2004;). Dentre os metabólitos a que comumente é atribuída a ação inibitória sobre o veneno estão os compostos polifenólicos (flavonoides, alcaloides, esteroides e terpenos e polifenóis) que têm a capacidade de precipitar proteínas e formar complexos com metais como o Ca^{2+} e Zn^{2+} , promovendo a diminuição da atividade da PLA₂ e metaloproteases, respectivamente (IGLESIAS *et al.*, 2005; MCDONALD *et al.*, 1996; PATIÑO *et al.*, 2012).

Vários extratos de espécies de *Capsicum* apresentaram propriedades anti-inflamatórias (HERNÁNDEZ-ORTEGA *et al.*, 2012; JANG *et al.*, 2011; JOLAYEMI e OJEWOLE, 2013; SPILLER *et al.*, 2008; ZIMMER *et al.*, 2012) em testes de migração de leucócitos e edema de pata. LEAL (2012) comprovou que os extratos hexânico e etanólico de *Capsicum chinense* apresentam também propriedades anti-inflamatórias.

Na composição das espécies do gênero *Capsicum*, já foram encontrados capsaicinóides, carotenoides e compostos fenólicos (LORENZI *et al.*, 2008; REIFSCHNEIDER, 2000).

O Presente estudo se propôs a verificar a capacidade de inibição do extrato bruto de *Capsicum chinense* em inibir a inflamação induzida pelo veneno de *Bothrops matto grossensis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos heterogênicos de linhagem Swiss e isogênicos de linhagem C-57 Black (*Mus musculus*) e ratos linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas e machos adultos de padrão sanitário convencional (ILAR, 1996) com massa corpórea entre 17 e 22g para camundongos e entre 245 e 255g para ratos. Os animais foram provenientes do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco, mantidos sob condições de temperatura (23-

25°C) e o ciclo claro/escuro (12/12horas) controlados, com livre acesso a ração e água. Todas as fases dos experimentos e procedimentos foram realizadas de acordo com as normas internacionais de ética em pesquisa com animais, com o protocolo número **003/13** do CEUA da Universidade Católica Dom Bosco.

2.2 Veneno

O pool de veneno liofilizado de *Bothrops matto grossensis* foi cedido pelo Biotério da Universidade Católica Dom Bosco, obtido de animais adultos de ambos os sexos com tempo mínimo de 6 meses de cativeiro. Foram considerados adultos os animais que mediram mais de 70cm de comprimento total no momento de entrada no Biotério UCDB (Nunes, 2006). Foi evitado um controle nos demais fatores que interferem na composição do veneno para garantir que os resultados expressem uma resposta mais fiel ao envenenamento da população de *B. matto grossensis* do estado, e não a um grupo específico. O veneno foi armazenado em freezer até o momento de sua utilização

2.3 Extrato de *Capsicum chinense*

Os frutos foram obtidos no Mercado Municipal de Campo Grande e possuem exsiccata depositada no herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob número de registro 33633.

Para obtenção do extrato de *C. chinense*, aproximadamente 2kg de frutos maduros e inteiros foram lavados e secos em estufa com circulação de ar a 40°C, e submetidos a extração por maceração a frio até o esgotamento por hexano e concentrados em evaporador rotatório, obtendo-se os respectivos extratos

2.4 Protocolo de Eutanásia

Os animais foram anestesiados com 150mg/kg de Ketamina e 7,5mg/kg de Xilazina. Após verificada a ausência de reflexos por pressão na pata traseira, foi realizado o deslocamento cervical.

2.5 Curva Dose Resposta de veneno

A determinação da dose de veneno a ser utilizada nos experimentos foi realizado um teste de indução de migração de leucócitos (item 3.7) em camundongos black. Os animais receberam inoculação (200µL i.p.) de Veneno de *Bothrops matto grossensis* nas doses 5, 15 e 30µg. O

controle negativo recebeu salina 0,9% (200µL i.p.). 6 horas após o estímulo, os animais foram eutanasiados para coleta do exsudato com EDTA/Salina (0,0327%). A quantificação total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer com o lavado diluído (1/20) em líquido de Turk. A contagem de leucócitos foi realizada nos 4 quadrados das pontas e multiplicada por 50.000. Os lavados foram centrifugados a 2500rpm por 5min e dos precipitados celulares foram feitos esfregaços corados com Panótico Rápido e observado em microscópio ótico em objetiva de imersão com aumento total de 1000X para contagem diferencial de leucócitos. Para os experimentos posteriores foi determinada a dose de 30µg.

2.6 Curva Dose Resposta – extrato

A determinação da dose de extrato a ser utilizada no experimento foi realizado um teste de indução de migração de neutrófilos (item 3.7) em camundongos Swiss. Os animais receberam injeção s.c. de extrato nas doses 5, 10 e 15mg/kg e após 15 minutos, inoculação do veneno de *Bothrops mattogrossensis* (30µg/200µL i.p.). O controle negativo recebeu salina 0,9% (200µL i.p.). 6 horas após o estímulo, os animais foram eutanasiados para coleta do exsudato com EDTA/Salina (0,0327%). A quantificação total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer com o lavado diluído (1/20) em líquido de Turk. A contagem de leucócitos foi realizada nos 4 quadrados das pontas e multiplicada por 50.000. Os lavados foram centrifugados a 2500rpm por 5min e dos precipitados celulares foram feitos esfregaços corados com Panótico Rápido e observado em microscópio ótico em objetiva de imersão com aumento total de 1000X para contagem diferencial de leucócitos. Para os experimentos posteriores foi determinada a dose de 30µg. Para os experimentos posteriores foi determinada a dose de 15mg/kg.

2.7 Atividade anti-inflamatória – Migração de neutrófilos

A avaliação da atividade anti-inflamatória, caracterizada pela inibição do acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal, foi realizada de acordo com MORENO *et al.* (2006).

Para tanto, dois testes em intervalos diferentes foram realizados. Os animais (Swiss, n=6) foram pré-tratados com extrato bruto hexânico (15µg/kg s.c.) e após 15 minutos receberam injeção do veneno de *Bothrops mattogrossensis* (30µg i.p.). O controle negativo recebeu salina (0,9% 200mL i.p.) e o controle positivo recebeu apenas o veneno (30µg i.p.). Após 6 e 12 horas do estímulo, os animais foram eutanasiados para coleta do exsudato com EDTA/Salina

(0,0327%). A quantificação total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer com o lavado diluído (1/20) em líquido de Turk. A contagem de leucócitos foi realizada nos 4 quadrados das pontas e multiplicada por 50.000. Os lavados foram centrifugados a 2500rpm por 5min e dos precipitados celulares foram feitos esfregaços. Os esfregaços foram corados com Panótico Rápido e observados em microscópio ótico em objetiva de imersão com aumento total de 1000X para contagem diferencial de leucócitos.

2.8 Atividade anti-inflamatória - Ação antiedematogênica

Para avaliar a ação antiedematogênica do extrato hexânico de *Capsicum chinense* foi seguida a metodologia proposta por Levy (1969). Os animais (Wistar, n=5) foram pré-tratados com extrato bruto hexânico (15µg/kg s.c.) e após 15 minutos receberam injeção do veneno de *Bothrops matto grossensis* (10µg s.p.). O controle negativo recebeu salina (0,9% 200mL s.p.) e o controle positivo recebeu apenas o veneno (30µg s.p.). As patas que receberam o estímulo foram avaliadas por meio da mensuração da espessura no aparelho Pletismômetro (INSIGHT) em diferentes intervalos de tempo (Zero, 30, 60, 120 e 240 minutos).

O edema foi expresso pelo volume da pata injetada em cada intervalo avaliado.

2.9 Análise estatística

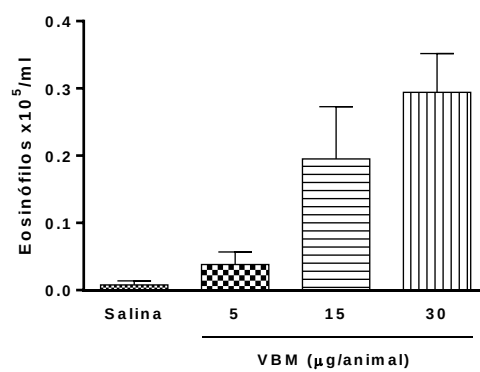
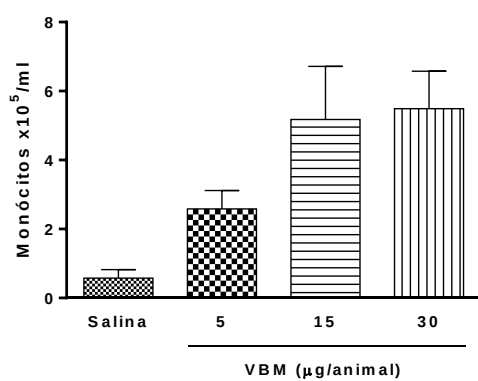
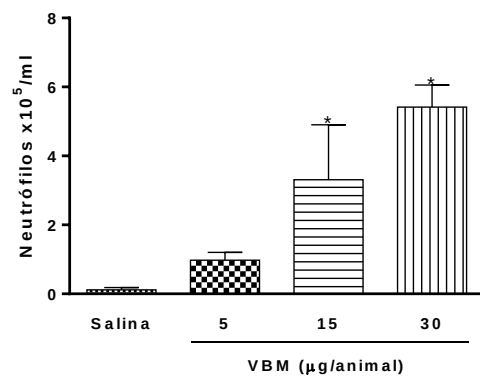
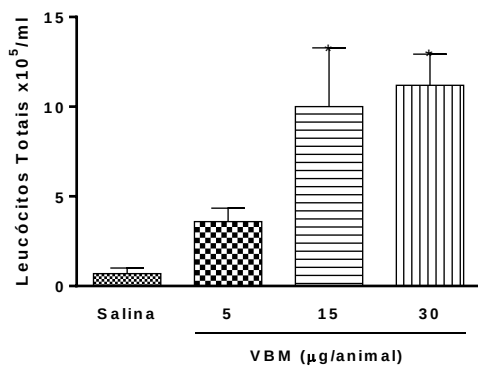
Os testes e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 6. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com 5% de significância usando o teste de Tukey como pós teste.

3 RESULTADOS

3.1 Curva dose-resposta para VBM

A curva de dose-resposta obtida no pré-teste para determinação da quantidade de veneno a ser utilizados nos testes deste experimento está mostrada na Figura 1. Nos camundongos isogênicos Black apenas a dose de 30µg/animal induziu uma resposta de migração de neutrófilos enquanto nos camundongos Swiss, a resposta na migração de neutrófilos foi observada nas doses de 15 e 30µg/animal.

a)



b)

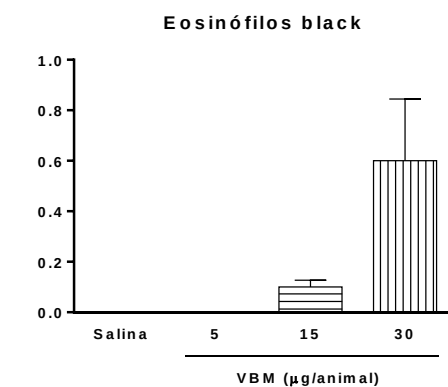
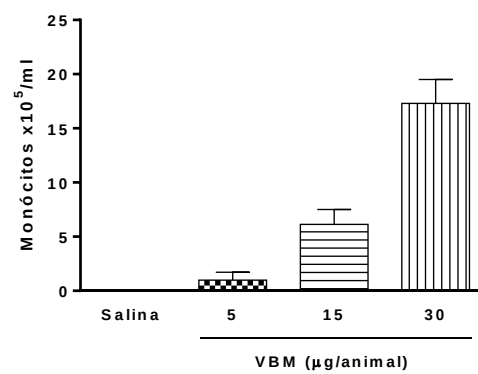
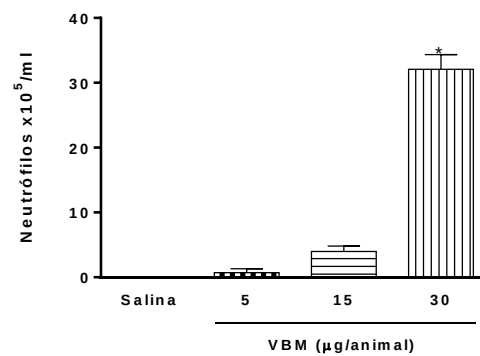
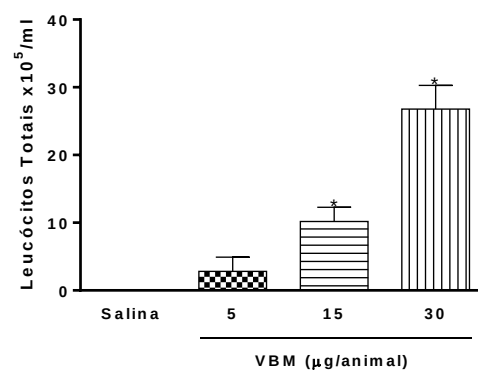


Figura 1. Curvas de dose-resposta de VBM (Veneno de *Bothrops matto grossensis*) em teste de migração de leucócitos em camundongos. a) Teste realizado em camundongos Swiss b) Teste realizado com camundongos isogênicos Black. A indução de migração de leucócitos foi realizada administrando VBM (5/15/30µg/200µL i.p.). O controle negativo Sal. recebeu salina 0,9% (200µL i.p.). Após 6 horas os animais foram eutanasiados para coleta do lavado peritoneal e foi realizada a contagem total e diferencial de células. Os dados representam a média ($\pm$ EPM) de 5 animais. * $p < 0,05$ em relação a Sal. (ANOVA).

3.2 Curva dose-resposta do extrato hexânico bruto na migração de leucócitos após 6 horas.

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi avaliada no tempo de 6h após a administração do VBM em camundongos. A figura 2 mostra a quantidade de leucócitos encontrada nas cavidades peritoneais dos animais dos diferentes tratamentos. Os tratamentos com concentração de extrato inferior a 15mg/kg, embora demonstrem aparente redução na migração de neutrófilos comparado aos animais não tratados, não apresentaram diferença com o valor obtido para o grupo controle positivo, porém também não apresentou diferença comparado ao controle negativo. Já a dose de 15mg/kg, mostrou redução no recrutamento de neutrófilos com relação ao grupo controle, sendo considerado como dose-resposta para efeitos deste experimento.

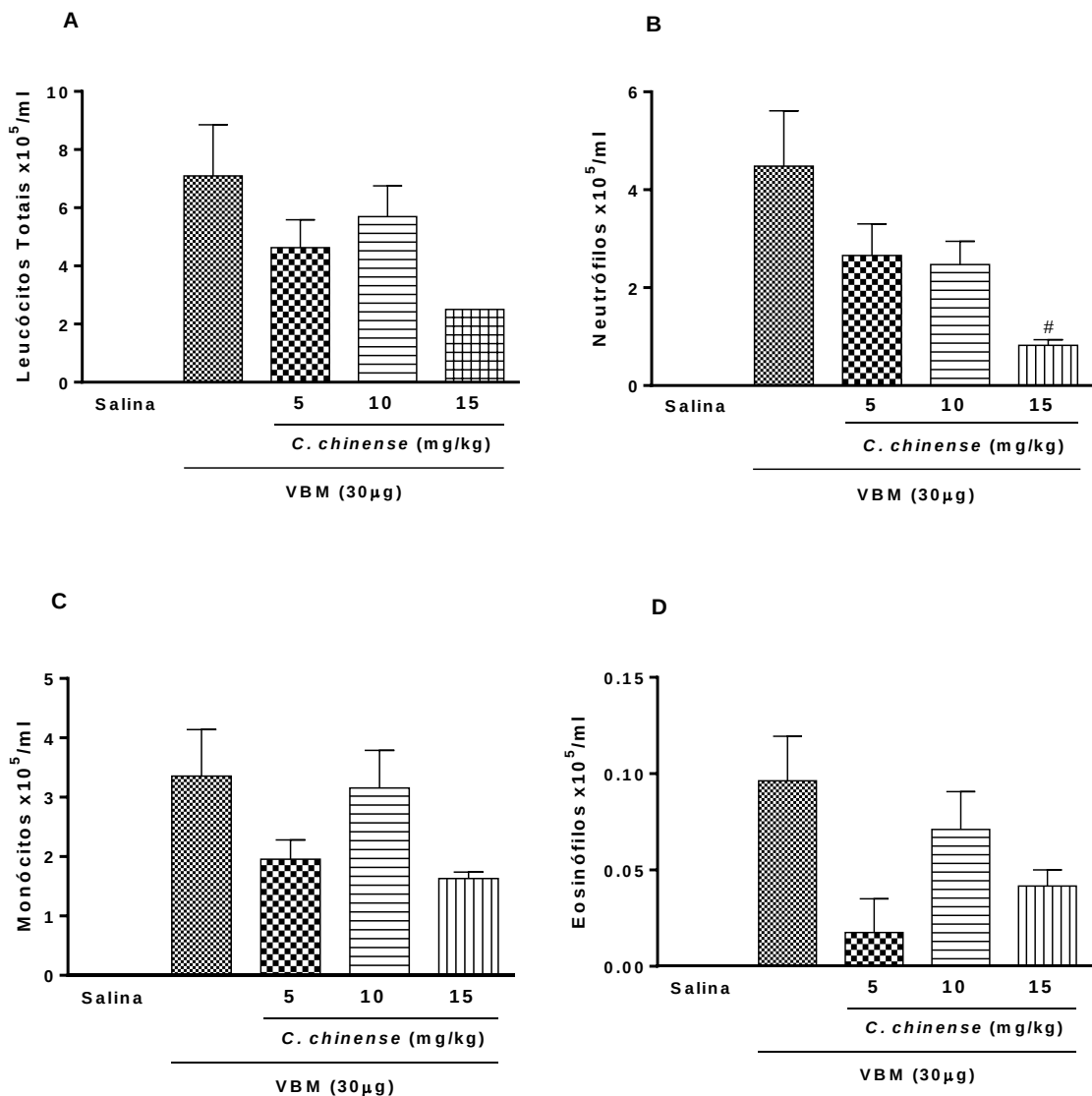


Figura 2. Avaliação do efeito do extrato hexânico bruto da *Capsicum chinense* variedade Bode sobre a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos induzido por VBM (Veneno de *Bothrops matogrossensis*). O efeito anti-inflamatório do extrato hexânico bruto da pimenta bode foi avaliado em camundongos Swiss (n=5) submetidos ao pré-tratamento com extrato bruto hexânico (5/10/15mg/kg, s.c) 15 minutos antes do estímulo inflamatório (VBM, 30 μg /200 μL i.p). O controle negativo recebeu salina 0,9% (200 μL i.p). Após 6 horas os animais foram eutanasiados para coleta de lavado peritoneal e realizada a contagem total e diferencial de leucócitos. Os dados representam a média ($\pm\text{EPM}$) de 5 animais. * $p < 0,05$ em relação a Sal. e # $p < 0,05$ em relação a VBM (ANOVA). A: Contagem total de leucócito; B: Contagem de neutrófilos; C: Contagem de Monócitos e D: Contagem de Eosinófilos.

3.3 Efeito da dose resposta do extrato hexânico bruto da variedade bode de *Capsicum chinense* na migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos após 12 horas de estímulo.

O efeito da dose resposta do extrato hexânico de *C. chinense* na migração de leucócitos foi observado 12h após a indução por VBM (figura 3). A concentração de 15mg/kg do extrato foi capaz de reduzir significativamente o recrutamento de neutrófilos, não tendo sido observado efeito no recrutamento dos demais tipos celulares analisados.

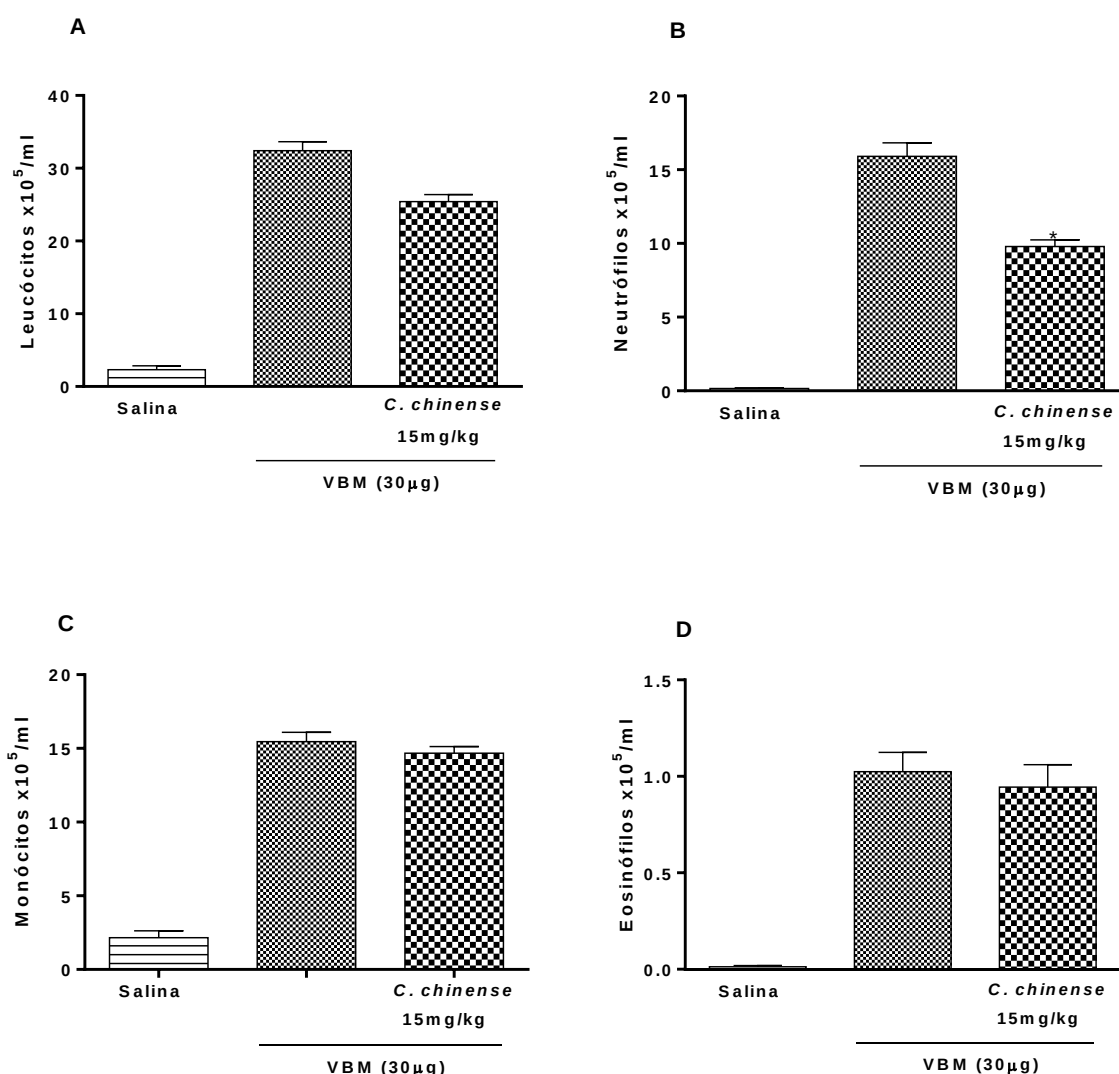


Figura 3. Efeito do extrato hexânico de *C. chinense* sobre a migração de leucócitos em cavidade peritoneal de camundongos induzido por VBM (Veneno de *Bothrops matogrossensis*). O efeito anti-inflamatório do extrato hexânico da pimenta bode foi avaliado em camundongos Swiss (n=6) submetidos ao pré-tratamento com extrato bruto hexânico (15mg/kg, s.c) 15 minutos

antes do estímulo inflamatório (VBM, 30 μ g/200 μ L i.p). O controle negativo (Salina) recebeu salina 0,9% (200 μ L i.p). Após 12 horas os animais foram eutanasiados para coleta de lavado peritoneal e realizada a contagem total e diferencial de leucócitos Os dados representam a média ($\pm$ EPM) de 6 animais. * p <0,05 em relação a Sal(ANOVA).

3.4 Efeito da dose resposta do extrato hexânico bruto da variedade bode de *Capsicum chinense* sobre o edema de pata em ratos.

Na evolução do edema de pata ao longo de quatro intervalos nas primeiras 4h (figura 4), tanto o grupo tratado com extrato de pimenta (Pim.) quanto o que recebeu apenas inoculação de veneno (VBM) apresentaram formação de edema depois de 2h de inoculação, não sendo encontrada, porém, diferença entre o edema apresentado entre esses grupos, em nenhum dos intervalos analisados.

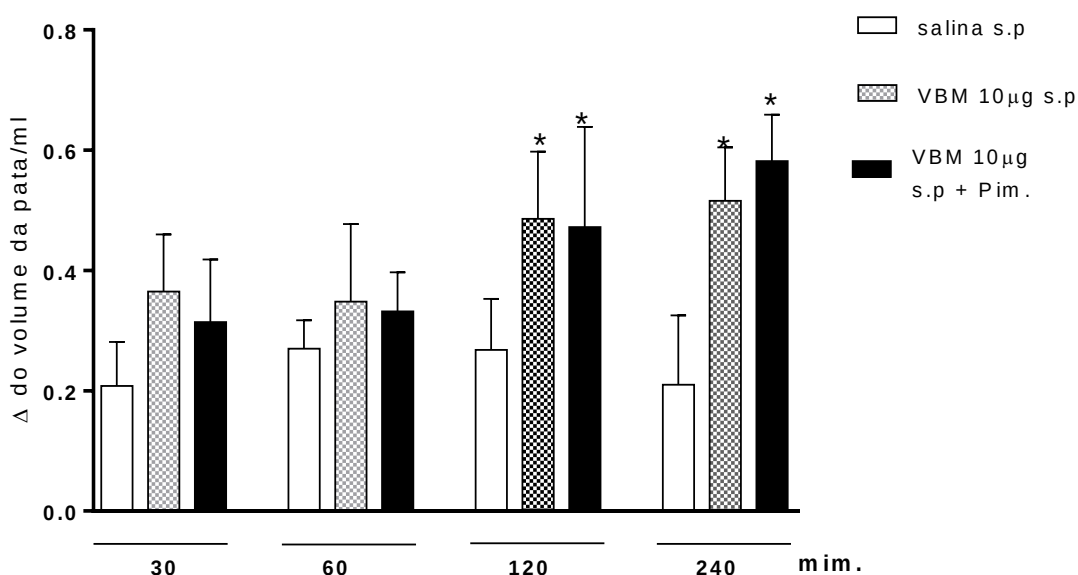


Figura 4. Efeito do extrato hexânico de *C. chinense* no edema de pata induzido por VBM (Veneno de *Bothrops matogrossensis*) em ratos Wistar. O efeito antiedematogênico do extrato hexânico bruto de *C. chinense* foi avaliado em ratos (n=5) submetidos ao pré-tratamento com extrato bruto hexânico (Pim, 15mg/kg, s.c) 15 minutos antes do estímulo inflamatório (VBM, 10 μ g/200 μ L i.p). O controle negativo Salina (Sal.) recebeu salina 0,9% (200 μ L i.p). Os dados representam média $\pm$ E.P.M. de 5 indivíduos. * p <0,05em relação ao grupo Sal. (ANOVA).

4 DISCUSSÃO

Embora a padronização de concentrações de VBM e extrato de *C. chinense* a serem usadas, bem como os testes de migração de neutrófilos serem realizados com camundongos Swiss e/ou Black, o teste de edema foi realizado com ratos Wistar. Isto se deve a que os ratos apresentam um melhor modelo para a realização deste tipo de teste, sendo comum trabalhos que realizam teste de edema de pata com ratos e os demais testes com camundongos (COSTA, 2004; SOUSA *et al.*, 2007)

A administração de soro antiofídico é o único tratamento reconhecido contra envenenamento por serpentes (GUTIÉRREZ *et al.*, 2011) e este é conhecidamente limitado quanto ao controle dos efeitos locais (GUTIÉRREZ *et al.*, 1998; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2007), que constituem as principais manifestações clínicas de envenenamento por *Bothrops* (FRANCO, 2003; GUTIÉRREZ, 1995). Frente a isso, diversos trabalhos têm testado plantas medicinais a procura de alternativas e/ou complementos ao soro (SOARES *et al.*, 2005). Várias plantas já tiveram seu potencial comprovado (PATRÃO-NETO *et al.*, 2013) e alguns metabolitos já foram identificados como potenciais responsáveis por estes efeitos (SÁEZ e SOTO, 2009).

Dentre os efeitos locais induzidos pelo envenenamento botrópico a inflamação possui um papel fundamental e é caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular, edema e infiltração de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (FARSKY *et al.*, 1997; ROSENFELD, 1971). Quando o agente agressor é um complexo de enzimas e proteínas tóxicas, como é o caso do veneno botrópico, o quadro inflamatório nem sempre resulta em um processo de regeneração, observando-se frequentemente uma cronificação da resposta (de PAULA, 2009).

Na literatura é possível encontrar vários extratos com comprovado efeito anti-inflamatório contra envenenamento por *Bothrops* (BORGES *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 1999; MAIORANO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; de PAULA, 2009; PATRÃO-NETO *et al.*, 2013; SÁEZ e SOTO, 2009; SAMY *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2004; TICLI *et al.*, 2005), embora a maioria destes testem este efeito apenas quanto à ação antiedematogênica dos extratos. De PAULA (2009), aponta a não existência de dados, na literatura e anteriores ao seu trabalho, sobre inibição por fitoterápico da migração leucocitária induzida por venenos e miotoxinas, efeito que também não foi encontrado no extrato testado em seu trabalho. Contudo, PATRÃO-NETO *et al.* (2013) descobriram que o extrato etanólico de *Eclipta próstata*

consegue reduzir os níveis de myeloperoxidase, cuja presença foi relacionada diretamente com a quantidade de neutrófilos no local de inflamação (PATRÃO-NETO *et al.*, 2013; ZAMUNER *et al.*, 2001).

Embora trabalhos com extratos vegetais inibindo veneno botrópico sejam comuns, a literatura sobre espécies de *Capsicum* apresentando efeito semelhante é escassa, sendo o trabalho de OTERO *et al.* (2000), um dos poucos publicados.

Contudo, pesquisas recentes com pimentas do gênero *Capsicum* evidenciam propriedades farmacológicas de algumas espécies. O extrato etanólico e butanólico da *C. baccatum*, por exemplo, mostrou-se provido de ação anti-inflamatória no modelo de pleurisia induzida por carragenina e efeito antioxidante pelo método DPPH (ZIMMER *et al.* 2012). Enquanto um estudo utilizando extratos etanólicos e metanólicos de plantas dessa família demonstrou que esses apresentam atividades analgésicas e anti-inflamatórias (JIMOH *et al.* 2011). Outro estudo com extrato metanólico da espécie *C. annum* revelou que o tratamento oral reduziu a inflamação alérgica das vias aéreas em camundongos, diminuindo também as espécies reativas de oxigênio (JANG *et al.* 2011).

Neste estudo foi possível identificar atividade anti-inflamatória a do extrato hexânico de *Capsicum chinense* a partir da dose de 15mg/kg, conseguindo inibir parte da migração de neutrófilos induzida pelo veneno de *Bothrops mattogrossensis*, similarmente ao observado anteriormente para *C. baccatum* e *C. annum* (JANG *et al.*, 2011; SPILLER *et al.*, 2008; ZIMMER *et al.*, 2012) emanando o efeito observado por LEAL (2012) no teste de migração de neutrófilos induzida por tioglicolato. Apesar de inibição de migração de neutrófilos induzida por veneno de *Bothrops* utilizando drogas anti-inflamatórias não seja novidade, tendo sido realizada por MORENO (1994) e PATRÃO-NETO *et al.* (2013). de PAULA (2009), indicou não existirem até a data do seu trabalho, fitoterápicos que apresentaram essa capacidade de inibição, sendo o experimento de PATRÃO-NETO *et al.* (2013) um dos registros posteriores a esse ano que conseguiram esse efeito, além do presente trabalho.

Embora a dose tenha sido suficiente para provocar inibição do efeito anti-inflamatório no teste de migração de neutrófilos, o teste de edema de pata não demonstrou nenhum efeito inibitório do extrato hexânico bruto sobre a indução promovida pelo veneno. Este resultado diverge do encontrado para testes de edema de pata realizados com *C. annum* e *C. frutescens* (HERNÁNDEZ-ORTEGA *et al.*, 2012; JOLAYEMI e OJEWOLE, 2013). LEAL (2012) também observou inibição do edema em alguns dos intervalos que avaliou no teste de edema de pata induzido por carragenina. Frente a isso, se levantam duas possíveis situações. A

primeira de que a dose-resposta para o teste de migração de neutrófilos talvez seja menor que a necessária para observar efeito inibitório no teste de edema para a dose de veneno usada. Ou os componentes de *C. chinense* com ação antiedematogênica não são capazes de inibir a ação das proteínas ofídicas que induzem este efeito.

LEAL (2012) sugere que os efeitos anti-inflamatórios de *Capsicum chinense* podem estar relacionados à presença de capsaicinóides e capsinóides, os quais, entre suas propriedades farmacológicas, podem apresentar efeito anti-inflamatório (ALTIER e ZAMPONI, 2004; FRAENKEL *et al.*, 2004; SHINTAKU *et al.*, 2012).

A extração de compostos ativos de plantas depende do tipo de solvente utilizado, por exemplo, o hexano sendo um solvente apolar remove lipídeos, carotenóides e clorofila, enquanto o metanol e etanol, como solventes polares extraem açúcares, ácidos orgânicos e fenóis de baixo peso molecular. O acetato de etila e éter dietílico extraem fenóis de baixo peso molecular, enquanto a acetona extrai fenóis poliméricos. Os capsaicinóides por serem fenóis, apresentam um certo nível de polaridade, contudo sua presença ainda é esperada em concentrações menores (MOURE *et al.* 2001). COSTA *et al.* (2009) realizaram a quantificação dos capsaicinóides em extratos e frações das espécies *C. frutescens* (malagueta), *C. annum* var. *annuum* (pimentão magali), *C. baccatum* var. *praetermissum* (cumari), demonstrando amplas variações nas concentrações desses capsaicinóides. Os extratos brutos e as frações hexânicas da *C. frutescens* e da *C. baccatum* apresentaram menor concentração de capsaicinóides, sendo que a fração clorofórmica da *C. baccatum* apresentou a maior concentração entre as frações e extratos testados.

Por outro lado, espécies de *Capsicum* também são ricos em outros metabólitos secundários como compostos fenólicos (REIFSCHNEIDER, 2000), flavonóides (LORENZI *et al.*, 2008), e taninos (MELO *et al.*, 2009) que também são capazes de inibir a ação inflamatória das metaloproteases e PLA₂ dos venenos ofídicos (CASTRO *et al.*, 1999; GIL *et al.*, 1997; IGLESIAS *et al.*, 2005; MCDONALD *et al.*, 1996; PATIÑO *et al.*, 2012). Apesar de metaloproteases e PLA₂ serem as principais responsáveis pelos efeitos locais do envenenamento botrópico e ambas serem aparentemente inibidas através de metabólitos quelantes de íons como os compostos fenólicos, não é possível determinar se um dos mecanismos de ação mencionados, é o responsável pelos resultados observados neste trabalho, sendo necessárias análises adicionais para elucidar estes fenômenos.

4.5 CONCLUSÃO

O extrato hexânico bruto de *Capsicum chinense* demonstrou-se eficaz para combater a migração de neutrófilos induzidos pelo veneno de *Bothrops matogrossensis*, mostrando-se uma potencial fonte de metabólitos a serem investigados para combater envenenamentos ofídicos.

4.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTIER, C.; ZAMPONI, G.W. Targeting Ca^{2+} channels to treat pain: T-type versus N-type. **Trends in Pharmacological Sciences**, 25, 465-470, 2004.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos: Revisão. **JBN**, São Paulo, v 65, 209-250, 1993.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTEIRO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia silvestres* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A_2 . **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 127, 21-31, 2000.

BUTTERFIELD, T.A.; BEST, T.M.; MERRICK, M.A. The dual roles of neutrophil and macrophages in inflammation: A critical balance between tissue damage and repair. **Journal of Athletic Training** vol 41 (4) 47-465, 2006.

CARNEIRO, A.S.; RIBEIRO, O.G.; CABRERA, W.H.; VORRARO, F.F.M.; IBANEZ, O.M.; STAROBINAS, N. *Bothrops jararaca* venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. **Toxicon** 52, 619–627, 2008.

CASTRO, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; BARRIOS, M.; CASTRO, I.; ROMERO, M.; UMAÑA, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes:

Viperidae) por extractos de plantas tropicales. **Revista de Biologia Tropical**, v. 47, 605-616, 1999.

COSTA, K.A. **Alodínia mecânica e edema de pata induzidos por um ativador da proteína quinase C, PDD: Caracterização e comparação com as respostas induzidas pela carragenina**. 2004. 114. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2004.

COSTA, E.P.; CLISSA, P.B.; TEIXEIRA, C.F.P.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake venom-induced local inflammation. **Inflammation** 26, 13–17, 2002.

COSTA, L. M.; MOURA, N. F.; MARANGONI, C.; MENDES, C. E.; TEIXEIRA, A. O. Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2009.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia Básica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 21-39, 1992.

da SILVA, N.M., ARRUDA, E.Z., MURAKAMI, Y.L., MORAES, R.A., EL-KIK, C.Z., TOMAZ, M.A., FERNANDES, F.F., OLIVEIRA, C.Z., SOARES, A.M., GIGLIO, J.R., MELO, P.A. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon** 50, 196–205, 2007.

DAVIES, M.J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **Journal of Clinical Biochemistry Nutrition** 48, 8–19, 2011.

De PAULA, R.C. **Efeito de Extratos vegetais sobre atividades biológicas do veneno da serpente *Lachesis muta***. 2009. 90p. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2009.

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

FRAENKEL, L.; BOGARDUS Jr., S.T.; CONCATO, J.; WITTINK, D.R. Treatment options in knee osteoarthritis: the patient's perspective. **Archives of Internal Medicine**, 164, 1299–1304, 2004.

FRANCO, L. F. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos no Brasil**. São Paulo, Editora Sarvier, p. 13-32, 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. Brasília: Funasa, 2001.

GIL, B.; SANZ, M.J.; TERCENIO, M.C.; GUNASEGARAN, R.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M.J. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A2 with antiinflammatory activity. **Biochemical Pharmacology** 53: 733-740, 1997.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. **Memórias do Instituto Butantan** 51: 211-223, 1989.

GUTIÉRRES, J.M.; NÚÑES, J.; DIAZ, C.; CINTRA, A.C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Experimental Molecular Pathology**, v.55, 217-29, 1991.

GUTIÉRREZ, J.M. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In J. Meier & J. White (eds.). **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. CRC, Boca Raton, Florida, p. 645-665, 1995.

GUTIEÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, R.M. (Ed.), **Venom Phospholipases A₂ Enzymes. Structure, Function and Mechanism**. Wiley, United Kingdom, pp. 321–352, 1997.

GUTIÉRREZ, J.M., G. LEÓN, G. ROJAS, B. LOMONTE, A. RUCAVADO & F. CHAVES. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon** 36: 1529-1538, 1998.

GUTIÉRREZ, J.M. Understanding snake venoms: 50 years of research in Latin America. **Revista de Biología Tropical**. 50, p377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 13, no. 28, pp. 2935–2950, 2007.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. **Biologicals**, vol. 39, no. 3, pp. 129–142, 2011.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, M.; ORTIZ-MORENO, A.; HERNANDÉZ-NAVARRO, M.D.; CHAMORRO-CEVALLOS, G.; DORANTES ALVAREZ, L.; NECOECHEA-MONDRAGÓN, H. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012, Article ID 524019, 10p. 2012

IGLESIAS CV, APARICIO R, RODRIGUES-SIMIONI L, CAMARGO EA, ANTUNES E, MARANGONI S, TOYAMA, D.O.; BERIAM, L.O.S.; MONTEIRO, H.S.A.; TOYAMA, M.H. Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA2). **Toxicon**, 46:751-8, 2005.

ILAR Institute for Laboratory Animal Resources – National Research Council. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Mexico: **Academia Nacional de Medicina**. 146p. 1996.

JANG, H. Y.; KIM, S. M.; YUK, J. E.; KWON, O. K.; OH, S. R.; LEE, H. K.; JEONG, H.; AHN, K. S. *Capsicum annuum* L. methanolic extract inhibits ovalbumin-induced airway inflammation and oxidative stress in a mouse model of asthma. **Journal of Medicinal Food**, 14, 1144-1151, 2011.

JIMOH, A. O.; CHIKA, A.; UMAR, M. T.; ADEBISI, I.; ABDULLAHI, N. Analgesic effects and anti-inflammatory properties of the crude methanolic extract of *Schwenckia americana* Linn (Solanaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 137, 543-546, 2011.

JOLAYEMI, A.T. and OJEWOLE, J.A.O. Comparative anti-inflammatory properties of Capsaicin and ethyl-aAcetate extract of *Capsicum frutescens* linn [Solanaceae] in rats. **African Health Sciences** 13(2): 357-361, 2013.

JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A., O'CONNELL, J.L. Prognostic factors for amputation in the case of envenoming by snakes of the Bothrops genus (Viperidae). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 93, 401–408, 1999.

KIM, C. S.; KAWADA, T.; KIM, B. S.; HAN, I. S.; CHOE, S. Y.; KURATA, T.; YU, R. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. **Cellular Signalling**, 15, 299-306, 2003.

KOH, D.C.I.; ARMUGAM, A.; AND JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 63, no. 24, pp. 3030–3041, 2006.

LEAL, A.P.F. **Avaliação das propriedades farmacológicas dos extratos brutos de duas variedades de *Capsicum chinense* Jacq.** 2012. 64p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2008.

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

MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.F.; OLIVEIRA, C.Z.; COUTO, L.B.; GOME, O.A.; FRANÇA, D.C.; SOARES, A.M.; PEREIRA, P.S. Antiophidian properties of

tha queous extract of Mikania glomerata. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, 364-370, 2005.

MCDONALD M, MILA I, SCALBERT A. Precipitation of metal ions by plant polyphenols: Optimal conditions and origin of precipitation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44:599-606, 1996.

MELO, R.F.; FARRAPO, N.M.; ROCHA-JUNIOR, D.S.; SILVA, M.G.; COGO, J.C.; DALBELO, C.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GROPPPO, F.C.; OSHIMA-FRANCO, Y. Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In **Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources**. Edited by Keller RB. New York: Nova Science Publishers; 249–262, 2009.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v.72, 145-171, 2001.

MORENO, S.E. **Estudo comparativo da resposta inflamatória, em ratos, induzida por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* em estágios distintos de desenvolvimento**. 1994, 68p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Biomédicas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1994.

MORENO, S. E.; ALVES-FILHO, J. C.; BERTOZI, G.; ALFAYA, T. M.; THÈZE, J.; FERREIRA, S. H.; VARGAFTIG, B. B. Systemic administration of interleukin-2 inhibits inflammatory neutrophil migration: role of nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, 1060-1066, 2006.

NUNES, S. F. **Dieta e biologia reprodutiva da cruzeira, *Bothrops alternatus* (Serpentes – Viperidae), na Região Sul do Brasil**. 2006, 68p. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2006.

OLIVEIRA, C.Z.; MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; SANT’ANA, C.D.; JANUÁRIO, A.H. LOURENÇO, M.V.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M.

Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia fortificata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98 213-216, 2005.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the hemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 73, p. 233-241, 2000.

PATÍÑO, A.C.; LOPEZ, J.; ARISTIZÁBAL, M.; QUINTANA, J.C.; BENJUMEA, D. 2012. Efecto inibitório de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). **Biomédica**, 32: 365-374, 2012.

PATRÃO-NETO, F.C.; TOMAZ, M.A.; STRAUCH, M.A.; MONTEIRO-MACHADO, M.; ROCHA-JUNIOR, J.R.; BORGES, P.A.; CALIL-ELIAS, S.; MELO, P.A. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, vol. 69 55-64, 2013.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. *Capsicum*: pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: **Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças**, 2000.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America, p. 345-384. In W. Bucherl & E. Buckley (eds.). **Venomous Animals and Their Venoms**. Academic Press, Nueva York, 1971.

SAÉS, J.A. E SOTO, J. P. Plantas alexitéricas: antídotos vegetales contra las picaduras de serpientes venenosas. **Medicina Naturista**, v. 3 p. 17-24, 2009.

SAMY, R.P.; THWIN, M.M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. E IGNACIMUTHU, S. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in southern part of Tamilnadu, **India**. **Journal of Ethnopharmacology**, 115 p 302-312, 2008.

SEGEL, G.B.; HALTERMAN, M.W.; LICHTMAN, M. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. **Journal of Leukocyte Biology** vol. 89 no. 3 359-372, 2011

SHINTAKU, K.; UCHIDA, K.; SUZUKI, Y.; ZHOU, Y.; FUSHIKI, T.; WATANABE, T.; YAZAWA, S.; TOMINAGA, M. Activation of transient receptor potential A1 by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. **British Journal of Pharmacology**, v.165, 1476-1486, 2012.

SOARES, A.M.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO, M.V.; PEREIRA, A.M.S.; PEREIRA, P.S. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs Future**, Barcelona, 29, 1105-1117, 2004.

SOUSA, O.V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALMEIDA, B.H.; MIRANDA, M.A.; FILGUEIRAS, R.C.; CAMPOS, A.C.; SILVÉRIO, M.S. Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueira acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p.51-56, 2007

SOUZA, L.G. **Efeito da fototerapia na reação inflamatória induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu* e por duas miotoxinas isoladas desse veneno.** 2010, 82p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale da Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, 2010.

SPILLER, F.; ALVES, M.K.; VIEIRA, S.M.; CARVALHO, T.A.; LEITE, C.E.; LUNARDELLI, A.; POLONI, J.A.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, J.R. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 60: 473-478, 2008.

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

TICLI, F.K.; HAGE, L.I.S.; CAMBRAIA R.S.; PEREIRA, P.S.; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.M.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, vol. 46, no. 3, pp. 318–327, 2005.

TRIBUIANI, N.; da SILVA, A.M.; FERRAZ, M.C.; SILVA, M.G.; BENTES, A.P.G.; GRAZIANO, T.S.; SANTOS, M.G.; COGO, J.C.; VARANDA, E.A.; GROPPPO, F.C.; COGO, K.; OSHIMA-FRANCO, Y. *Vellozia flavicans* Mart. Ex Schult. Hydroalcoholic extract inhibits the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, vol. 14 (1) 48, 2014

WARRELL, D.A. Clinical features of envenoming from snake bites, p. 64-76. In **C. Bon & M. Goyffon (eds.). Envenomings and Their Treatments**. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, 1996

WARRELL, D.A. Snake bites 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**. Comstock Publishing Associates, NY, USA, 709–761, 2004.

ZAMUNER, S.R., GUTIERREZ, J.M., MUSCARA, M.N., TEIXEIRA, S.A., TEIXEIRA, C.F. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon** 39, 1505–1513, 2001.

ZIMMER, A. R.; LEONARDI, B.; MIRON, D.; SCHAPOVAL, E.; OLIVEIRA, J. R.; GOSMANN, G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. **Journal Ethnopharmacology**, 139, 228-233, 2012.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho chamam para a necessidade de identificação de metabólitos no extrato de *C. chinense* e a identificação dos mecanismos de ação, uma vez que foi evidenciada a ação promissora no combate a efeitos locais de envenenamento botrópico, podendo dar origem a futuros isolados a serem usados no tratamento de envenenamento.

6. Anexo 1 – guide for authors, *Toxicon*

Official Journal of The International Society on Toxinology (<http://www.toxinology.org/>), *Toxicon*'s "aims and scope" are laid down in the journal as:

To publish:

- articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms
- papers on novel findings related to the chemical, pharmacological, toxicological, and immunological properties of natural toxins
- molecular biological studies of toxin and other genes from poisonous and venomous organisms that advance understanding of the role or function of toxins
- clinical observations on poisoning and envenoming where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been obtained
- material on the use of toxins as tools in studying biological processes and material on subjects related to venom-antivenom problems
- review articles on problems related to toxinology.

And

To encourage the exchange of ideas, sections of the journal may be devoted to Short Communications, Letters to the Editor and activities of the International Society on Toxinology.

Toxicon strives to publish articles that are current and of broad interest and importance to the toxinology research community. Emphasis will be placed upon articles that further the understanding and knowledge of toxinology.

Types of paper

Full-Length Research Papers: Articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms.

Short Communications: Short communications differ from full manuscripts only in that the research study does not lend itself to an extended presentation. Even though brief, the Short communication should represent a complete, coherent and self contained study. The quality of Short Communications is expected to be as good as that of full articles, and both full articles and Short communications will be refereed in an identical manner. The form is identical to that for a full article except that the report should not be divided into Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. An abstract of not more than 75 words should be provided. The Short Communication may not be longer than five double-spaced typewritten pages (not including references, tables and figures) and should include not more than two tables of two figures or one of each.

Letters to the Editor: These may be published if judged by the Editor to be of interest to the broad field of toxinology or of special significance to a smaller group of workers in a specialized field of toxinology. They should be headed 'Letter to the Editor' which should be followed by a title for the communication. Names of authors and affiliations should be at the end of the letter.

Announcements: *Toxicon* will only accept for publication announcements of great interest to toxinologists, such as notices of appropriate meetings and symposia and activities of the International Society of Toxinology.

Reviews and mini-Reviews: Articles of interest to toxinologists which are published in journals other than *Toxicon* may be abstracted in the Reviews section of *Toxicon*. Readers who feel that a particular article or book should be abstracted in this section are encouraged to bring their opinions to the attention of one of the Review Editors. Mini-Reviews and proposals for mini-Reviews are welcome

Molecular Biology: Papers on molecular biological aspects of toxins are welcome. They can include cloning, expression, genetic and related studies. The papers must add to the understanding of the role or function of toxins. Papers providing cDNA sequences without any relevant conclusions are not acceptable. If cDNA sequences are included, authors must guarantee that the sequences will be deposited in a public gene bank before the publication of the paper in *Toxicon*.

Clinical reports: *Toxicon* will publish clinical reports on poisoning where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been established. Please observe the following: [Clinical Reports Guidelines](#)

Classic Toxins: The main aim of these articles is to educate and inform both the experienced scientist and new scientists entering the field of toxinology. These articles should serve as a reference guide for anyone using toxins. Please contact Dr. Ed Rowan with your suggestions for inclusion in the 'classic toxins' feature.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of Interest

Toxicon follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission:

1. All third-party financial support for the work in the submitted manuscript.
2. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript.
3. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission.
4. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported.
5. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued).
6. Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded [here](#), or at http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the popup menu.)

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted

manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy:

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$3,000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to five individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering– this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with

Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 125 characters including spaces, or, maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.

- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word

Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic

version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly

given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.