

## Potencial de extratos aquosos dos frutos de *Clusia fluminensis* em neutralizar efeitos locais causados por veneno de *Bothrops jararaca*

### *Potential of Clusia fluminensis Fruit Extracts to Neutralize Local Effects Caused by the Venom of Bothrops jararaca snake.*

Marcia Pietrolungo,<sup>a,b,\*</sup> Aldo R. da Silva,<sup>c</sup> André L. Fuly,<sup>c</sup> Eládio F. Sanchez,<sup>d</sup> Adriana Q. Lobão,<sup>e</sup> Alessandra L. Valverde,<sup>f</sup> Selma R. de Paiva<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal Fluminense, PPGCAPS, Faculdade de Farmácia, CEP 24241-000 Niterói-RJ, Brasil.

<sup>b</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Farmanguinhos, CEP 22775-903, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

<sup>c</sup>Universidade Federal Fluminense, Departamento de Biologia Celular e Molecular, CEP 24020-141 Niterói-RJ, Brasil.

<sup>d</sup>Centro de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, CEP 30510-010, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>e</sup>Universidade Federal Fluminense, Departamento de Biologia Geral, CEP 24020-141 Niterói-RJ, Brasil.

<sup>f</sup>Universidade Federal Fluminense, Departamento de Química Orgânica, CEP 24020-141 Niterói-RJ, Brasil.

\*E-mail: [mpietrolungo@gmail.com](mailto:mpietrolungo@gmail.com)

Recebido: 22 de Março de 2021

Aceito: 22 de Março de 2021

Publicado online: 28 de Julho de 2021

The objective of this study was to produce and evaluate the aqueous extracts of fruits of *Clusia fluminensis* against some local effects triggered by the venom of the snake *Bothrops jararaca*. *C. fluminensis* fruits collected in May and August 2018 and March and June 2019 were used. After fragmentation and drying of the vegetable raw material, it was characterized and the results found were in accordance with the pharmacopoeial specifications. The extracts were prepared by infusion and later lyophilized. The cytotoxic potential of the extracts was previously evaluated by the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) in spleen T lymphocyte culture from BALB-C mice. The four samples tested maintained the cell viability of T lymphocytes above 80%, allowing them to be tested against proteolytic, hemolytic, and coagulant activities of *B. jararaca* venom. The aqueous extracts of the fruits of *C. fluminensis* were incubated for 30 minutes at 25 °C with the venom of *B. jararaca* and, then, proteolytic, hemolytic and coagulation activities were evaluated. The percentage of inhibition of all samples of extracts tested in the proteolytic and hemolytic activities of the venom of *B. jararaca* was close to 100%. Besides, the samples of *C. fluminensis* prevented *B. jararaca* venom-induced coagulation in the 1:20 ratio (venom:plant), signaling perspective in the treatment of support to sorotherapy.

**Keywords:** Plant extracts; Clusiaceae; snake envenoming; neglected tropical disease

## 1. Introdução

O Brasil é detentor da maior diversidade de flora e fauna do planeta e de um valioso conhecimento tradicional sobre o uso de plantas medicinais. Uma das plantas nativas e endêmicas do país é *Clusia fluminensis* Planch. & Triana, pertencente a família Clusiaceae caracterizada quimicamente pela presença de xantonas, benzofenonas, flavonoides, cumarinas, terpenoides, esteroides entre outras substâncias.<sup>1-4</sup> A espécie tem sido alvo de pesquisas envolvendo peçonhas de diferentes serpentes. Estudos anteriores do nosso grupo, demonstraram potencial atividade de extratos de *C. fluminensis* na neutralização de efeitos locais causados pelo envenenamento ofídico.<sup>5,6</sup>

Classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como doença tropical negligenciada, os acidentes por animais peçonhentos e, em particular, os acidentes ofídicos, foram incluídos, em 2010, na Lista Nacional de Notificação Compulsória (LNC) do Brasil. Os dados epidemiológicos são subestimados já que os acidentes acontecem principalmente em áreas de difícil acesso. As sequelas deixadas são graves e causam impacto sócio econômico, uma vez que podem levar a amputações de membros e incapacitação do indivíduo para o trabalho.<sup>7-9</sup> Entre as espécies de serpentes venenosas conhecidas no Brasil, as pertencentes às famílias Elapidae e Viperidae, são consideradas de interesse médico no país.<sup>10</sup>

O veneno de serpentes é uma mistura complexa de toxinas, amins vasoativas, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos e íons inorgânicos, como cálcio, zinco, sódio, entre outros. É capaz de interferir no sistema nervoso central, cardiovascular, muscular, hemostático, renal e vascular do indivíduo ou animal picado.<sup>9</sup> O veneno botrópico, produzido pelas serpentes do gênero *Bothrops sp.*, induzem inflamação aguda no local da lesão e distúrbio da coagulação levando a uma hemorragia local e sistêmica. A presença de trombina-símile e outros componentes ativadores da coagulação sanguínea no veneno botrópico disparam a cascata de coagulação, clivam fibrinogênio e formam fibrina intravascular levando à incoagulabilidade sanguínea. A atividade hemorrágica é um sinal característico do envenenamento botrópico.<sup>10-12</sup>

O tratamento indicado em todo o mundo é a soroterapia, desenvolvida em 1894 e que teve a produção implantada no Brasil em 1901, por Vital Brazil. A soroterapia é bastante eficaz na reversão dos efeitos sistêmicos provocados pelo veneno no organismo da vítima, porém, estudos têm demonstrado pouca eficácia frente à neutralização dos efeitos locais associados a morbidades graves nos acidentados.<sup>11</sup>

Frente ao exposto, torna-se importante a busca por novos tratamentos antiveneno que possam complementar e dar suporte à soroterapia na neutralização dos efeitos tóxicos desencadeados.

O objetivo deste estudo foi produzir e avaliar os extratos aquosos de frutos de *C. fluminensis* frente a alguns efeitos locais desencadeados pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Coleta e processamento do material vegetal

Frutos de *C. fluminensis* foram coletados em maio e agosto de 2018 e março e junho de 2019 na área do Forte Barão do Rio Branco em Jurujuba, Niterói, conforme autorização de coleta da 21ª Artilharia de Campanha do Exército Brasileiro. A coleta foi feita em afloramento rochoso (22º 16' 17" S/ 44º 21' 59" W) e exemplares férteis foram herborizados, identificados e depositados no herbário de Niterói da Universidade Federal Fluminense, sob o número de registro NIT 10340. O estudo se encontra cadastrado junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, sob número A3E1AD00. O material botânico coletado foi levado para a Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos localizada no campus Fiocruz Mata Atlântica onde os frutos foram fragmentados manualmente e submetidos à secagem em estufa a 40°C. A secagem foi considerada satisfatória quando o material vegetal atingiu perda em torno de 80% do peso inicial. O material vegetal seco foi submetido à fragmentação em moinho de facas e a droga vegetal obtida foi codificada da seguinte forma:

0518, 0818, 0319 e 0619: provenientes dos frutos coletados em maio/2018, agosto/2018, março/2019 e junho/2019, respectivamente.

### 2.2. Caracterização da matéria-prima vegetal

A matéria-prima vegetal fragmentada foi submetida a testes de granulometria, densidade batida, índice de intumescência e teor de umidade no Laboratório de Farmacotécnica Experimental-Farmanguinhos/Fiocruz; análise microbiológica no Laboratório de Controle da Qualidade do Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos/Fiocruz e teor total de cinzas na Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos/ Fiocruz de acordo com as recomendações descritas na IN 04/14 seguindo os protocolos descritos na Farmacopeia Brasileira 6ª edição.<sup>13,14</sup>

**Teor de Umidade:** 1,0g de amostra foi adicionada ao prato da balança de infravermelho (Gehaka, modelo: IV2000) que foi previamente programada para analisar teor de líquido/total. O resultado foi expresso em teor de umidade da amostra.

**Análise Granulométrica:** foi utilizada uma sequência de tamises com diferentes aberturas de malha: 12, 25, 45, 60, 80 e 120, equivalentes a 1700 µm, 710 µm, 355 µm, 250 µm, 180 µm e 125 µm, respectivamente. O agitador de peneiras (BerTel, modelo: 1040) foi ligado e manteve as vibrações por um tempo total de 60 minutos dividido em intervalos de 30, 15 e 15 minutos. Após cada intervalo as peneiras foram pesadas (Balança analítica M214Ai, Weblabor). O tamanho das partículas foi avaliado pela quantificação percentual de retenção de material em cada tamis.

**Densidade Compactada:** foi utilizada uma proveta graduada de 100 mL e determinou-se o volume ocupado (densidade bruta) por 25 g de amostra. O equipamento (PT-TD200 Tap Density Tester, Pharmatest) promoveu 500, 750 e 1250 batimentos da proveta e a cada intervalo o volume ocupado foi registrado (densidade compactada) e a taxa percentual de diferença entre as densidades foi fornecida.

**Índice de Intumescência:** a matéria-prima vegetal fragmentada foi colocada em uma proveta de 25 mL. O volume ocupado por 1,0 g da amostra foi medido como volume inicial. Em seguida, foram adicionados 25 mL de água destilada e a proveta foi agitada a cada 10 minutos durante 1 hora. Após repouso de 3 horas à temperatura ambiente, foi verificado o volume final ocupado pelo material vegetal. O índice de intumescência foi obtido de acordo com a fórmula: Índice de Intumescência =  $(V1 - V0) / V0$  Onde: V1 = volume final do material vegetal; V0 = volume inicial do material vegetal. Foram conduzidas, simultaneamente, três determinações de cada amostra.

**Determinação de Teor de Cinzas:** foram pesados 3,0 g do fruto seco e triturado que foi transferido para um recipiente previamente calcinado, resfriado e pesado. A amostra foi aquecida, gradativamente, aumentando a temperatura até no máximo 600 ± 50 °C, utilizando um gradiente de temperatura de 30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C, até que todo o carvão fosse eliminado. A amostra foi resfriada em dessecador e pesada. Segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição, o limite máximo de cinzas totais aceitável para drogas vegetais varia de 2 a 20% nas diferentes monografias.

**Análise Microbiológica:** a avaliação microbiológica foi realizada através de metodologia geral descrita na Farmacopeia Brasileira sexta edição para produtos não-estéreis. As análises foram feitas em triplicata. As amostras que apresentaram crescimento foram submetidas a ensaios para pesquisa de patógenos (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*).

### 2.3. Obtenção dos extratos

Os extratos foram preparados no Laboratório de Farmacotécnica Experimental-Farmanguinhos/Fiocruz por

método de infusão conforme preconizado no Formulário de Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira.<sup>14</sup> Foram feitos testes para otimizar a proporção droga:solvente. Foram testadas as proporções de 1:5; 1:6; 1:8 e 1:10. Sobre o material fragmentado foi adicionada água destilada em ebulição. O recipiente foi tampado, deixado em repouso até alcançar temperatura ambiente (25°C). O extrato aquoso filtrado foi submetido à liofilização (Liofilizador CHRIST, modelo: Gamma 2-16 LSC plus) e os extratos aquosos liofilizados obtidos foram codificados como:

EL518, EL818, EL319 e ELF619: provenientes dos frutos coletados em maio/2018, agosto/2018, março/2019 e junho/2019.

O rendimento extrativo foi calculado pela razão da massa do extrato seco pela massa do material vegetal seco e fragmentado: Teor de extração = (Peso do extrato bruto seco / Peso da matéria-prima vegetal) x 100.

#### 2.4. Análise de citotoxicidade

Os extratos aquosos liofilizados dos frutos de *C. fluminensis* (EL518, EL818, EL319 e EL619) foram avaliados quanto à citotoxicidade através do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio) em cultura de linfócitos T de baço de camundongos BALB-C. Células previamente semeadas em placas de 96 poços foram cultivadas em presença de diferentes concentrações das amostras (1-200µg/mL) por 48h e incubadas com solução de MTT. Após adição de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazam, a absorbância foi medida a 540nm em espectrofotômetro de ultravioleta (Shimadzu-UV mini 1240).

#### 2.5. Atividade antiveneno

Os extratos aquosos liofilizados dos frutos de *C. fluminensis* (EL518, EL818, EL319 e EL619) foram submetidos à atividade antiveneno *in vitro* no Laboratório de Venenos e Toxinas de Animais e Avaliação de Inibidores (LAVENOTOXI) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Atividade Proteolítica:** foi determinada utilizando-se azocaseína como substrato. A avaliação do efeito neutralizante dos extratos dos frutos foi feita com pré-incubação dos mesmos nas proporções de 1:10 e 1:20 (veneno:extrato) com o veneno bruto por 30 minutos a 25 °C. Alíquotas do veneno foram incubadas com azocaseína 0,2 % (p/v) em tampão 200 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,8. O volume final (1,2 mL) da reação foi completado pela adição de 150 mM NaCl. Em seguida as amostras-teste foram incubadas a 37°C e após 90 minutos a reação foi interrompida pela adição de 0,4 mL ácido tricloro acético 10%. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos, e 1 mL do sobrenadante foi retirado e adicionado a 0,5 mL NaOH 2 N. A atividade proteolítica foi quantificada em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) em

absorbância (A) 420 nm. Valores lidos nesse comprimento de onda correspondem a 70-80% da atividade máxima da reação. Inicialmente foi realizada uma curva concentração x efeito (resposta), utilizando-se diferentes concentrações do veneno. A concentração efetiva de veneno foi designada como a quantidade de veneno (µg/mL) capaz de produzir uma variação de 0,2 em A420 nm.<sup>15</sup>

**Atividade Anticoagulante:** diferentes concentrações de veneno de *B. jararaca* foram adicionados ao plasma e o tempo de coagulação foi monitorado usando um coagulômetro digital Amelung (modelo KC4A, Labcon, Alemanha). A concentração mínima coagulante (CMC) do veneno de *B. jararaca* capaz de coagular o plasma por cerca de 60 segundos foi de 25 µg / mL. O veneno de foi incubado por 30 min a 25 °C com extrato do fruto de *C. fluminensis* (veneno: extrato 1:10 e 1:20 p/p). Após a incubação, a mistura foi adicionada ao plasma e a coagulação foi monitorada. Para controle foi utilizado extrato ou solução salina com plasma.

**Atividade Hemolítica:** o grau de hemólise foi determinado por teste hemolítico indireto utilizando-se hemácias humanas lavadas e emulsão de gema de ovo de galinha, como substrato. O veneno de *B. jararaca* foi incubado com os extratos (1:10 e 1:20 p / p, veneno: extrato) por 30 minutos a 25° C. Como controle, o veneno foi incubado com solução salina, na ausência dos extratos ou adicionando apenas os extratos da planta ao meio de reação sem o veneno.

Os dados apresentados são médias expressas ± S.E.M de três experiências individuais (n = 3). \* p <0,05 em relação a *B. jararaca* + salina.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Caracterização da matéria-prima vegetal e obtenção dos extratos aquosos

Antes da obtenção de extratos, deve-se considerar o controle da qualidade da matéria-prima vegetal. Especificações presentes em monografias oficiais representam os critérios mínimos que devem ser cumpridos para garantir que os processos de coleta, processamento e armazenamento do material vegetal sejam adequados.<sup>16-18</sup>

O teor de umidade é um parâmetro importante, uma vez que o excesso de água em matérias-primas vegetais possibilita a ação de enzimas, além de propiciar o desenvolvimento de fungos e bactérias.<sup>19</sup> Sendo assim, o processo de secagem deve ser bem conduzido. A Farmacopeia Brasileira preconiza percentual de umidade de no máximo 14% para drogas vegetais. As quatro amostras apresentaram teores de umidade menores que 3% atendendo ao critério máximo especificado.

A análise granulométrica da matéria-prima vegetal fragmentada fornece dados do tamanho das partículas envolvidas no processamento. Os resultados têm influência

direta na eficiência do processo. Fragmentos muito grandes impedem a penetração do solvente no tecido vegetal uma vez que as paredes celulares íntegras formam uma barreira. Por outro lado, a moagem excessiva também não é adequada podendo compactar a droga vegetal e também dificultar a penetração do solvente no tecido vegetal.<sup>20</sup> Nessa etapa da pesquisa para desenvolvimento de um insumo farmacêutico ativo vegetal, a granulometria sinaliza, principalmente, reprodutibilidade do processo, facilitando a tomada de decisão em etapas futuras. Não foram encontrados estudos de perfil granulométrico dos frutos de *C. fluminensis* então foram utilizadas as malhas sugeridas pela Farmacopeia Brasileira. As amostras 0518, 0818, 0319 e 0619 apresentaram 42,0%, 45,2%, 50,3% e 51,6%, respectivamente de retenção de fragmentos na peneira 25 (abertura de malha 710 µm), sinalizando reprodutibilidade do processo de moagem.

A avaliação da densidade das matérias-primas vegetais é outro parâmetro importante na etapa de desenvolvimento e, assim como a granulometria, também exerce influência no processo de extração. A densidade indica o volume ocupado nos equipamentos tais como os tanques de extração.<sup>17</sup> Para as matérias-primas vegetais com especificações oficiais definidas, valores de densidade muito discrepantes podem chamar atenção para adulterações com outras partes do vegetal ou até mesmo outras espécies vegetais.<sup>16,17</sup> Os resultados de densidade encontrados para as amostras de matéria-prima vegetal provenientes do fruto de *C. fluminensis* apresentaram resultados próximos (Tabela 1).

A partir dos valores de densidade aparente pode-se calcular os índices de compressibilidade e a relação de Hausner descritas para drogas vegetais. Os parâmetros fornecem características do fluxo do material, que foi considerado bom para todas as amostras. Uma vez que não existe especificação para *C. fluminensis*, os valores obtidos podem servir de referência para o controle da qualidade, já que a amostra foi previamente selecionada, sendo constituída exclusivamente de frutos da espécie estudada.

O índice de intumescência foi conduzido para auxiliar em etapas futuras. Materiais com grandes quantidades de mucilagens e pectinas aumentam seu volume quando em contato com solventes.<sup>16</sup> Não existe especificação para índice de intumescência e os valores obtidos para as amostras dos frutos fragmentadas de *C. fluminensis*, não apresentaram diferença significativa (Tabela 1). Embora os

resultados sejam informativos, podem auxiliar na escolha das dimensões dos equipamentos que serão utilizados no processo de extração. Esse auxílio é essencial no momento da transposição para escala industrial.

O teor de cinzas é outro importante parâmetro utilizado no controle da qualidade de drogas vegetais. Os componentes inorgânicos extrínsecos tais como areia, pedra, gesso e terra diferem da composição inorgânica de drogas vegetais (carbonatos, fosfatos, cloretos e óxidos) e podem ser provenientes de falta de cuidado na preparação ou falsificação do produto.<sup>17</sup> Embora não existam parâmetros de referência descritos na Farmacopeia Brasileira para *C. fluminensis*, as amostras analisadas apresentaram percentual de cinzas totais menores que 4,5%, mantendo-se abaixo do limite máximo de 20% preconizado pela maioria das monografias de drogas vegetais.

Os ensaios microbiológicos foram realizados com a matéria-prima vegetal seca e triturada seguindo a orientação da Farmacopeia Brasileira sexta edição. O compêndio especifica os limites microbianos para produtos não estéreis que serão submetidos a métodos de extração a quente, como por exemplo a infusão. A contagem total de microrganismos viáveis determina o número de bactérias e fungos presentes em matérias-primas não-estéreis. Os limites estão especificados na tabela 2.

Todos os estudos foram feitos em triplicata e as amostras apresentaram valores de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) dentro das especificações da Farmacopeia Brasileira sexta edição. As amostras que apresentaram algum crescimento de microrganismos foram submetidas a ensaios para pesquisa dos patógenos *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Tabela 2). Os microrganismos específicos não foram detectados nas amostras de drogas vegetais. Os resultados corroboram com dados de outros estudos, com drogas vegetais obtidas em mercados da Inglaterra, Brasil, Áustria e Alemanha, que relataram a baixa ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* e ausência de *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus* nas amostras vegetais analisadas.<sup>19,20</sup>

Embora as amostras de matéria-prima vegetal obtidas dos frutos de *C. fluminensis* não tenham apresentado desvio na análise de microrganismos, o controle de qualidade microbiológico não deve ser negligenciado. Estudos de Bugno e colaboradores analisaram drogas vegetais disponíveis comercialmente para uso oral na cidade de

**Tabela 1.** Pâmetros relacionados à densidade e intumescência das amostras de frutos secos fragmentados de *Clusia fluminensis*

Amostra	Índice de intumescência	Densidade bruta (g/mL)	Densidade compactada (g/mL)	Índice de compressibilidade	Relação de Hausner	Fluxo
0518	1,33	0,543	0,625	13	1,15	Bom
0818	1,70	0,532	0,625	15	1,18	Bom
0319	1,76	0,543	0,595	13	1,14	Bom
0619	1,64	0,543	0,625	13	1,15	Bom

0518: frutos coletados em maio de 2018; 0818: frutos coletados em agosto de 2018; 0319: frutos coletados em março de 2019; 0619: frutos coletados em junho de 2019

**Tabela 2.** Resultados da avaliação microbiológica do material vegetal seco e triturado de frutos de *Clusia fluminensis*

Patógeno	Especificação	0518	0818	0319	0619
Bactérias aeróbicas totais	10 <sup>7</sup> UFC/g	<10 <sup>4</sup> UFC/g	<10 <sup>4</sup> UFC/g	2x10 <sup>4</sup> UFC/g	<10 <sup>4</sup> UFC/g
Fungos e leveduras	10 <sup>4</sup> UFC/g	<10 <sup>2</sup> UFC/g	33x10 <sup>2</sup> UFC/g	82x10 <sup>2</sup> UFC/g	33x10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella sp.</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

UFC (Unidades formadoras de colônias); 0518: frutos coletados em maio de 2018; 0818: frutos coletados em Agosto de 2018; 0319: frutos coletados em março de 2019; 0619: frutos coletados em junho de 2019

São Paulo e os resultados apontaram 58,5% e 63,1% das amostras em não conformidade com a especificação bacteriana e fúngica adotada, respectivamente, o que pode apresentar risco à saúde do consumidor.<sup>21</sup>

O guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico e registro e notificação de produto tradicional fitoterápico, descreve que a qualidade desses produtos deve ser assegurada com o controle de todas as etapas de sua produção, desde o processamento da droga vegetal até a obtenção do insumo farmacêutico ativo (IFA) de origem vegetal ou produto intermediário. Além disso, as regulamentações constantes no consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos definem as diretrizes para o registro e boas práticas de fabricação de produtos e IFA de origem vegetal.<sup>22-24</sup>

Após o beneficiamento primário da planta (coleta, separação, secagem e fragmentação) para a obtenção da matéria-prima vegetal, foi iniciada a obtenção dos extratos aquosos a partir dos frutos de *C. fluminensis*. Para isso, foram conduzidos testes para otimização do processo extrativo com a amostra 0518. A etapa de otimização de rendimento não é uma exigência regulatória porém, a possibilidade de aumentar o rendimento do processo extrativo de maneira racional, considerando volume de solvente, disponibilidade de amostra e o custo, justificam a realização. Foram testadas as proporções de 1:5; 1:6; 1:8 e 1:10 (droga:solvente) e a proporção 1:8 foi a que apresentou melhor resultado (Tabela 3).

### 3.2. Citotoxicidade dos extratos aquosos

Antes de submeter as amostras de extratos aquosos liofilizados aos testes antiveneno, foi verificada a citotoxicidade

das mesmas. Para isso, a medida da viabilidade e de proliferação celular foi conduzida utilizando o ensaio *in vitro* de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e os resultados estão apresentados na Figura 1. Este ensaio consiste na redução do sal tetrazólio por atividade metabólica celular, em parte por ação de enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria, resultando no formazan, uma substância de cor roxa que pode ser solubilizada e quantificada por espectrofotometria (570 nm). Assim, os eventos metabólicos de apoptose ou necrose que levam à uma diminuição na viabilidade da cultura celular, podem ser quantificados.

Segundo a metodologia proposta, concentrações que induzam morte celular igual ou acima de 10% são consideradas citotóxicas e não seguiriam para ensaios *in vivo*. Porém, nesse estudo as concentrações foram superestimadas (200 µg/mL) para atingir o valor de morte celular considerado citotóxica. Todas as quatro amostras testadas mantiveram a viabilidade celular dos linfócitos T acima de 80% (Figura 1). Os resultados corroboram com os dados da toxicidade, avaliada *in vitro* pelo método de hemocompatibilidade, obtidos pelo nosso grupo utilizando extratos aquosos de frutos, folhas e caule de *C. fluminensis*.<sup>6</sup> A concentração também foi superestimada e a hemólise das hemácias não ultrapassou 10%.

### 3.3. Atividade proteolítica, hemolítica e coagulante dos extratos aquosos

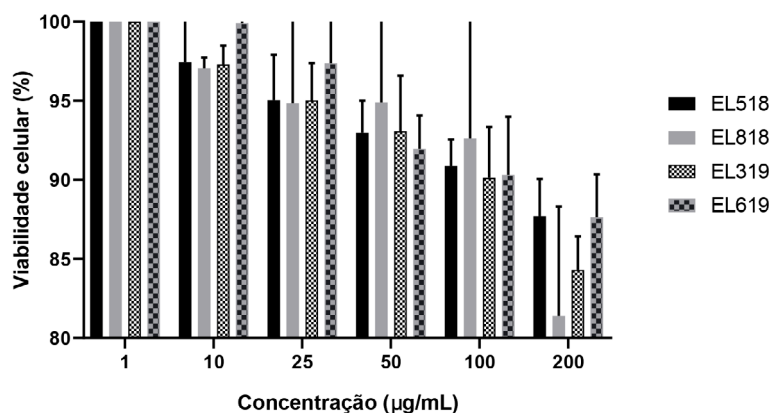
A busca por alternativas terapêuticas de fontes naturais capazes de inibir os principais efeitos tóxicos dos venenos botrópicos e reduzir os danos causados por acidentes ofídicos tem sido alvo de estudos envolvendo diferentes espécies vegetais.<sup>25-28</sup> Nesse estudo, o veneno de *B.*

**Tabela 3.** Percentual de sólidos obtidos com diferentes proporções de solvente, para a Amostra 0518 de frutos secos de *Clusia fluminensis*.

Amostra 0518			
Materia-prima vegetal seca(g): solvente (mL)	Peso da Materia-prima vegetal seca (g)	Peso extrato seco liofilizado (g)	Teor de extração (%)
1:5	20,00	1,62	8,12
1:6	20,00	3,15	15,75
1:8	20,00	4,14	20,70
1:10	20,00	4,17	20,85

Amostra 0518: Frutos coletados em maio de 2018





**Figura 1.** Avaliação da viabilidade celular em linfócitos T de baço de camundongos BALB-C com extratos aquosos liofilizados dos frutos de *Clusia fluminensis*. Legenda: EL518, EL818, EL319 e EL619: extratos provenientes dos frutos coletados em maio de 2018, agosto de 2018, março de 2019 e junho de 2019, respectivamente. Os dados são as médias de três experimentos ( $n = 3$ ) com o desvio padrão

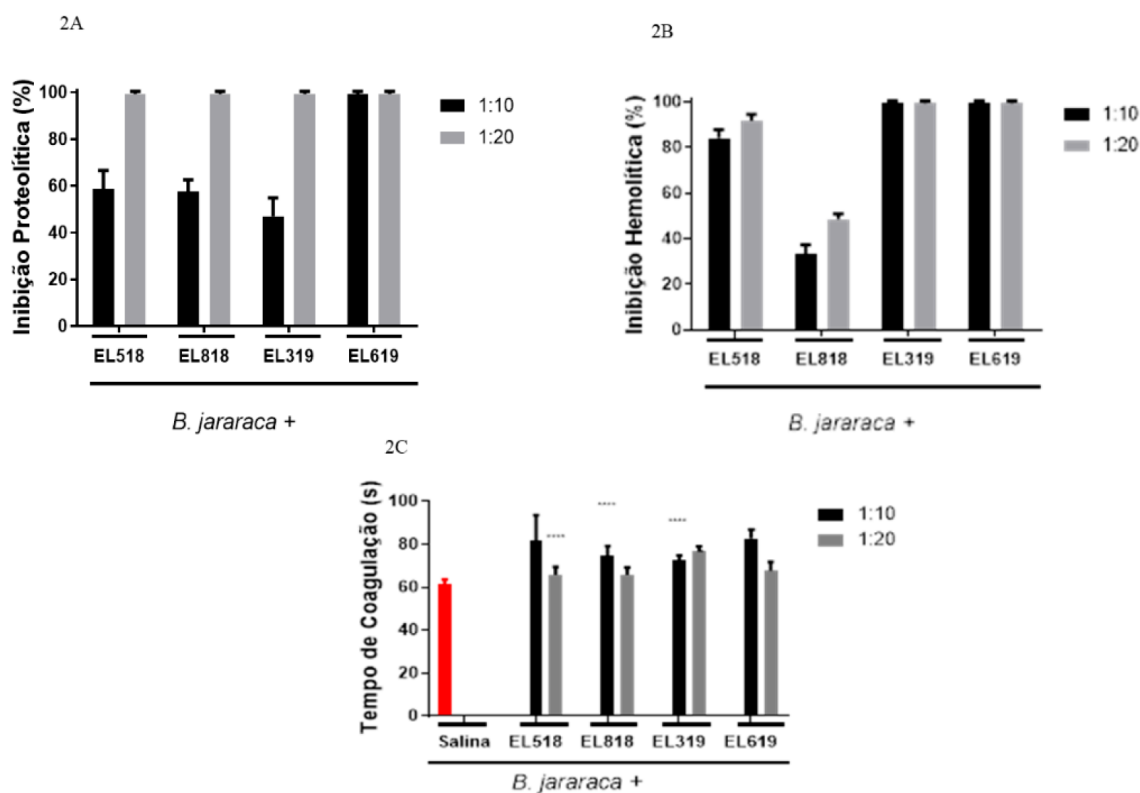
*jararaca* (25  $\mu\text{g/mL}$ ) foi incubado por 30 minutos a 25 °C com solução salina ou com os extratos dos frutos da *C. fluminensis* na proporção veneno:extrato (p/p) 1:10 ou 1:20.

As atividades proteolítica (Figura 2A), hemolítica (Figura 2B) e coagulante (Figura 2C), foram conduzidas conforme descrito nos métodos.

As amostras EL518, EL818, EL319 e EL619 inibiram totalmente a proteólise, na proporção de 1:20 p/p

(veneno:extrato). Na proporção 1:10 p/p (veneno:extrato) a inibição proteolítica máxima foi verificada apenas na amostra EL619. As amostras EL319, EL518 e EL818 mantiveram inibição proteolítica entre 40% e 60% (Figura 2A).

Os extratos EL518, EL319 e EL619 nas proporções 1:10 e 1:20 p/p (veneno:extrato) inibiram a hemólise do veneno de *B. jararaca*. Apenas a amostra EL818 apresentou menor percentual de inibição no efeito hemolítico do veneno (Figura 2B).



**Figura 2.** Efeito inibitório dos extratos dos frutos da planta *Clusia fluminensis* nas atividades tóxicas induzidas pelo veneno de *Bothrops jararaca*. O veneno de *B. jararaca* (25  $\mu\text{g/mL}$ ) foi incubado por 30 minutos a 25 °C com solução salina ou com os extratos dos frutos da planta *C. fluminensis* na proporção veneno:extrato (p/p) 1:10 (colunas pretas) ou 1:20 (colunas cinzas). Em seguida, foram determinadas as atividades proteolítica (2A), hemolítica (2B) e coagulante (2C), conforme descrito nos métodos. Os dados são médias expressas  $\pm$  S.E.M de três experiências individuais ( $n = 3$ ). \*  $p < 0,05$  em relação a *B. jararaca* + salina.

O efeito dos extratos aquosos liofilizados de *C. fluminensis* na atividade coagulante causada pelo veneno de *B. jararaca* está demonstrada na Figura 2C. Para esse ensaio foi utilizada uma CMC do veneno de *B. jararaca* de 25µg/mL. Todas as amostras de extratos inibiram a coagulação do plasma causada pelo veneno de *B. jararaca*, nas duas proporções testadas (1:10 e 1:20), ou seja, retardando o tempo de coagulação do plasma.

Estudos anteriores, conduzidos por Oliveira e colaboradores, com extratos não aquosos de diferentes partes de *C. fluminensis*, demonstraram neutralização, em diferentes graus, dos efeitos tóxicos causados por acidentes ofídicos. Extratos metanólicos e acetônicos dos frutos e caule assim como o extrato acetônico dos frutos de *C. fluminensis* inibiram a proteólise *in vitro* causada pelo veneno botrópico, com valores próximos a 100%. Porém, a inibição da atividade coagulante não foi observada.<sup>5</sup>

Da Silva e colaboradores conduziram estudos com extratos aquosos de diferentes partes de *C. fluminensis* e apresentaram resultados promissores de inibição da atividade dos venenos de *B. jararaca* e *Bothrops jararacussu*. Os extratos da folha, caule e fruto foram capazes de inibir todas as atividades tóxicas testadas, exceto o extrato de folhas que não foi capaz de prolongar o tempo de coagulação contra o veneno de *B. jararaca*. Os resultados apontaram que, dentre os extratos testados, os extratos aquosos do fruto de *C. fluminensis*, foi o mais ativo, inibindo completamente as atividades proteolíticas, hemolíticas e coagulantes do veneno.<sup>6</sup>

Outras espécies do gênero *Clusia* L. foram testadas frente à envenenamento botrópico. Extratos hidroalcoólicos de diferentes partes de *Clusia torresii* e *Clusia palmana*, aplicados em modelo animal, apresentaram ação na neutralização do efeito hemorrágico induzido pela peçonha de *Bothrops asper*.<sup>27</sup> A neutralização total da atividade hemorrágica do veneno pelos extratos das espécies *C. torresii* e *C. palmana*, corroboram com os resultados de inibição hemolítica encontrada nesse estudo.

Os extratos aquosos de *C. fluminensis* inibiram a atividade coagulante, proteolítica e hemorrágica dos venenos de *B. jararaca*, nos quais as enzimas metaloproteínases e serina proteases estão fortemente envolvidas.<sup>29-30</sup>

As benzofenonas poliiisopreniladas e os altos teores de flavonoides, descritos na caracterização química da família apresentam potencial de inibir as serino-proteases, além de interagirem com as enzimas fosfolipase A2, envolvidas na inflamação.<sup>30-32</sup> Embora seja conhecido que as enzimas metaloproteínases e serino-proteases atuam na patogênese de envenenamentos com lesão tecidual, inflamação e distúrbios do sistema hemostático, pouco se sabe sobre o mecanismo inibitório de ação dos extratos vegetais brutos sobre as toxinas e deve ser alvo de novas investigações.<sup>34</sup>

#### 4. Conclusão

As espécies vegetais são uma rica fonte de substâncias com atividades bioativas promissoras. O beneficiamento

e transformação de plantas medicinais em produtos finais e/ou intermediários como as drogas vegetais, extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos, resulta em produtos de maior valor agregado. Embora as drogas vegetais sejam amplamente comercializadas, os insumos farmacêuticos ativos vegetais (IFAV) são constituídos principalmente por extratos secos cuja obtenção permeia por processos que devem ser estabelecidos e padronizados. A estabilidade físico química e microbiológica do produto intermediário não deve ser negligenciada para que se produza produto final dentro dos critérios de qualidade e segurança. A caracterização da matéria prima vegetal proveniente dos frutos de *C. fluminensis* atendeu às especificações farmacopeicas e apresentou dados que podem subsidiar o controle da qualidade com vistas à produção de um IFAV.

Os extratos vegetais são misturas complexas de substâncias que desempenham ação isoladamente ou em sinergismo. Sendo assim, a parte vegetal e a polaridade do solvente utilizado no preparo dos extratos devem ser consideradas.

Os estudos com extratos aquosos de frutos de *C. fluminensis* foram conduzidos após a verificação da ausência de citotoxicidade dos mesmos. Os resultados obtidos demonstraram o potencial desses extratos em neutralizar atividades tóxicas do veneno de *B. jararaca*. Porém, outras atividades biológicas envolvidas no envenenamento ofídico, como por exemplo edematogênica e miotóxica, devem ser avaliadas.

O estudo sinaliza perspectivas no tratamento de suporte à soroterapia com diminuição das morbidades associadas a uma doença tropical negligenciada.

#### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código 001; Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (INCQS/FIOCRUZ); Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos (Fiocruz), Laboratório de Controle da Qualidade do Instituto de Tecnologia em Fármacos/Fiocruz e ao Laboratório de Farmacotécnica Experimental (LabFE) - Farmanguinhos/FIOCRUZ. À Dra. Alessandra Lifschitz Viçosa, por permitir acesso ao Laboratório de Farmacotécnica Experimental para realização das análises. Ao Comando da 21ª Artilharia de Campanha do Exército Brasileiro e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ.

#### Referências Bibliográficas

- Anholeti, M. C.; Duprat, R. C.; Figueiredo, M. R.; Kaplan, M. A. C.; Santos, M. G.; Gonzalez, M. S.; Ratcliffe, N. A.; Feder, D.; Paiva, S. R.; Mello, C. B.; Biocontrol Evaluation of Extracts and a Major Component, Clusianone, from *Clusia fluminensis* Planch. & Triana Against *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2015**, *110*, 629. [CrossRef] [PubMed]

2. Anholeti, M. C.; Paiva, S. R.; Figueiredo, M. R.; Kaplan, M. A. C.; Chemosystematic Aspects of Polyisoprenylated Benzophenones from the Genus *Clusia*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2015**, *87*, 289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ferreira, R.; Carvalho, M. G.; Silva, T. M. S.; Ocorrência de Biflavonoides em Clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. *Química Nova* **2012**, *35*, 2271. [[CrossRef](#)]
4. Silva, M. C. A.; Paiva, S. R.; Antioxidant Activity and Flavonoid Content of *Clusia fluminensis* Planch. & Triana. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2012**, *84*, 609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Oliveira, E. C.; Anholeti M. C.; Domingos, T. F.; Nunes C. F.; Sanchez, E. F.; Paiva, S. R.; Fuly, A. L.; Inhibitory Effect of the Plant *Clusia fluminensis* Planch & Triana against Biological Activities of *Bothrops jararaca* Snake Venom. *Natural Product Communications* **2014**, *9*, 21. [[PubMed](#)]
6. Da Silva, A. R.; Anholeti, M. C.; Pietroluongo, M.; Sanchez, E. F.; Valverde, A. L.; Paiva, S. R.; Figueiredo, M. R.; Kaplan, M. A. C.; Fuly, A. L.; Utilization of the Plant *Clusia fluminensis* Planch & Triana Against some toxic activities of the venom of *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* Snake Venom Toxic Activities. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2019**, *19*, 1990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 2001. [[Link](#)]
8. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/>>. Acesso em: 20 junho 2020.
9. Pinho, F.; Pereira, I. D. Ofidismo.; *Revista da Associação Médica Brasileira* **2001**, *47*, 24. [[CrossRef](#)]
10. Koh, D. C. I.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K.; Snake Venom Components and their Applications in Biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2006**, *63*, 3030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Cunha, L. E. R.; Soros Antiofídicos: história, evolução e futuro. *Journal Health NPEPS* **2017**, *1*. [[Link](#)]
12. Matsui, T; Fujimura, Y; Titani, K.; Snake Venom Proteases Affecting Hemostasis and Thrombosis. *Biochimica Biophysica Acta* **2000**, *1477*, 146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *Farmacopeia Brasileira* 6ª ed., 1, Brasília, 2019. [[Link](#)]
14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira 1ª ed., Brasília, **2011**. [[Link](#)]: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/14/Formulario-de-Fitoterapicos-da-Farmacopeia-Brasileira-sem-marca.pdf>
15. Garcia, E. S.; Guimaraes, J. A.; Prado, J. L.; Purification and Characterization of a Sulfhydryl-Dependent Protease from *Rhodnius prolixus* Midgut. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1978**, *188*, 315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Calixto, J. B.; Efficacy, Safety, Quality Control, Marketing and Regulatory Guidelines for Herbal Medicines (phytotherapeutic agentes). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2000**, *33*, 179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Simoes, C. M. O.; Schenkel, E. P. A.; Pesquisa e a Produção Brasileira de Medicamentos a Partir de Plantas Medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2002**, *12*, 35. [[CrossRef](#)]
18. Santos, P. R. V.; Oliveira, A. C. X.; Tomassini, T. C. B.; Controle Microbiológico de Produtos Fitoterápicos. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo* **1995**, *31*, 35. [[Link](#)]
19. Czech, E.; Kneifel, W.; Kopp, B.; Microbiological Status of Commercially Available Medicinal Herbal Drugs a Screening Study. *Planta Medica* **2001**, *67*, 263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Alexander, R. G.; Wilson, D. A.; Davidson, A. G.; Medicines Control Agency Investigation of the Microbial Quality of Herbal Products. *Pharmaceutical Journal United Kingdom* **1997**, *259*, 259. [[Link](#)]
21. Bugno, A.; Buzzo, A.; Aparecida, N.; Cristina, T.; Matos, T. C. P. D. P.; Terezinha J. A.; Avaliação da Contaminação Microbiana em Drogas vegetais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **2005**, *41*, 491. [[CrossRef](#)]
22. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de Normas de Registro e Notificação de Fitoterápicos, de 26 de outubro de 2018, Brasília, **2018**. [[Link](#)]
23. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa Nº 39, de 21 de agosto de 2019. *Diário Oficial da União* 22 de agosto **2019**, 162, 1. 87. [[Link](#)]
24. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 69, de 08 de dezembro de 2014. *Diário Oficial da União* 09 de dezembro **2014**, 238, 43. [[Link](#)]
25. Silva, P. T.; Moura M. V.; Souza, A. Y. L.; Sousa, L. R.; Mourão V. H. R.; Santos, C. M.; Espécies Vegetais Utilizadas no Bloqueio da Atividade Hemorrágica Induzida pelos Venenos de Serpentes do Gênero *Bothrops*. *Scientia Amazonia* **2017**, *6*, 36. [[Link](#)]
26. Vilar, J. C.; Carvalho, F. C. M.; Domingues M. F.; Effects of the Aqueous Extracts of Plants of the Genera *Apodanthera* (Cucurbitaceae) and *Jatropha* (Euphorbiaceae) on the Lethality of the Venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). *Biologia Geral Experimental* **2007**, *7*, 32. [[Link](#)]
27. Farrapo, N. M.; Silva, G. A. A.; Costa, K. N.; Silva, M. G.; Cogo, J. C.; Belo, C. A. D.; Santos, M. G.; Groppo, F. C.; Franco-Oshima, Y.; Inibition of *Bothrops jararacussu* Venom Activities by *Plathymenia reticulata* Benth Extracts. *Journal of Venom Research* **2011**, *2*, 52. [[PubMed](#)]
28. Castro, O.; Gutiérrez, J. M.; Barrios, M.; Castro, I.; Romero, M.; Umaña, E.; Neutralization of the Hemorrhagic Effect Induced by *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) Venom With Tropical Plant Eextracts. *Revista de Biología Tropical* **2009**, *47*, 605. [[PubMed](#)]
29. Kondo, H.; Kondo, S. I.; Kegawa, H.; Murata, R.; Oshaka, A.; Studies on the Quantitative Method for Determination of Hemorrhagic Activity of Habu Snake Venom. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* **1960**, *3*, 969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Melo, P. A., Suarez-Kurtz, G.; Release of Creatine kinase from Skeletal Muscles by *Bothrops* venoms, Heparin Potentiation of Inhibition by Antivenin. *Brazilian Journal Medical Biological Research* **1988**, *21*, 545. [[PubMed](#)]
31. Alves, T. M. A.; Alves, R. O.; Romanha, A. J.; Santos, M. H. S.; Nagem, T. J.; Zani, C. L.; Biological Activities of 7-Epiclusianone. *Journal of Natural Products* **1999**, *62*, 369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Oliveira, C. M. A.; Porto, A. L. M.; Bittrich, V.; Marsaioli, A. J.; Two Polyisoprenylated Benzophenones from the Floral Resins of Three *Clusia* Species. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1073. [[CrossRef](#)]



33. Gil, B.; Sanz M. J.; Terencio, M. C.; Gunasegaran, R.; Payá, M.; Alcaraz, M. J.; Morelloflavone, a Novel Biflavonoid Inhibitor of Human Secretory Phospholipase A2 with Anti-inflammatory Activity. *Biochemical Pharmacology* **1997**, *53*, 733. [[CrossRef](#)]
34. Soares, M.; Fontes, M. R. M.; Giglio, J. R.; Phospholipase A2 Myotoxins from Bothrops Snake Venoms: structure-function relationship. *Current Organic Chemistry* **2004**, *8*, 1677. [[CrossRef](#)]