



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CÂMPUS DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO AMBIENTE

SÁRA CÓSTA FERREIRA RODRIGUES

ESTUDO DA PROPRIEDADE ANTIOFÍDICA DE *Jatropha elliptica* (Pohl.) Mull Arg.

**PALMAS, TO
2020**

SÁRA CÓSTA FERREIRA RODRIGUES

ESTUDO DA PROPRIEDADE ANTIOFÍDICO DE *Jatropha elliptica* (Pohl.) Mull Arg.

Orientadora: Dr^a. Carla Simone Seibert

Co-orientador: Dr. Marcio Galdino dos Santos

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Doutorado em Ciências do Ambiente, da Universidade Federal do Tocantins, na linha de pesquisa Biodiversidade e Recursos Naturais.

**PALMAS, TO
2020**

SÁRA CÓSTA FERREIRA RODRIGUES

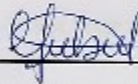
SÁRA CÔSTA FERREIRA RODRIGUES

ESTUDO DA PROPRIEDADE ANTIOFÍDICA DE *Jatropha elliptica* (Pohl.) Mull Arg.

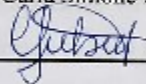
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Doutorado em Ciências do Ambiente, da Universidade Federal do Tocantins, na linha de pesquisa Biodiversidade e Recursos Naturais.

Data de Aprovação: 27/11/2020

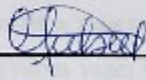
Banca Examinadora:



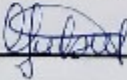
Profª. Dra. Carla Simone Seibert – Orientadora



Profª. Dra. Marisa Maria Teixeira Rocha



Profª. Dra. Yoko Oshima Franco



Profª. Dra. Elisandra Scapin



Profª. Dra. Ana Daisy A. Zagallo

AGRADECIMENTOS

*Pai, venho Te dizer
Que Tu és o meu lugar seguro
O motivo da minha canção
E com meu coração quero Te adorar
Exaltar Teu Santo nome
Pai, Te louvo,
As palavras não podem dizer
O quanto eu Te amo,
E como eu preciso de Ti.
“Kleber Lucas”*

Muitas pessoas caminharam comigo e, se não tivessem, esta etapa não teria sido possível. Portanto, **agradeço e dedico**.

Ao meu esposo, **Cássio Milhomens Rodrigues** pelo suporte e sacrifício em todo o tempo.

Ao meu filhinho, **Oliver Cósta Rodrigues**, que mesmo sem saber me encorajou a não desistir pois ao vê-lo tão pequeno, quis dar o melhor de mim para dar exemplo e mostrar que o esforço e dedicação, além de necessários, devem fazer parte de nossa vida e que os frutos são apenas consequências.

Minha mãe, **Silvia Costa Ferreira**, mulher virtuosa, incansável, forte como aço, tão companheira. Sorriu, entristeceu, preocupou-se comigo me incentivando quando minhas forças se esgotavam.

Ao meu irmão **Demétrio da Costa Ferreira**, mais uma vez me auxiliando na coleta da planta.

À **Lethiza**, minha sobrinha, pelas várias vezes que cuidou do meu filho para que eu pudesse estudar.

À **Elieth Madeira de Lima** pela amizade, pelo apoio preciso.

Ao **Fernando Pacheco** pela disposição sempre em ajudar.

À Profa. Dr^a **Carla Simone Seibert**, minha orientadora, pela oportunidade concedida, pelo conhecimento partilhado, pela direção tão importante que culminou nesta tese e pela paciência em meio a tantas dificuldades que surgiram durante este período.

Ao **Marcio Trevisan**, pelas palavras de incentivo e apoio.

À **Raiany Cristine Cruz da Silva** pela ajuda na captura e busca das serpentes, também por confiar a mim parte do seu trabalho.

À Profa. Dr^a **Yoko Oshima Franco**, que mais uma vez abriu as portas (literalmente) de sua casa para mim e minha família. Obrigada pela amizade, carinho... Repito aqui o que disse por ocasião do mestrado: O privilégio maior de nos conhecermos certamente foi meu.

Ao “Edinho”, Dr. **Edson Hideaki Yoshida**, tão solícito.

À **Jaqueline de Cássia Proença Assunção, Isadora Caruso Fontana Oliveira e Anna Paula Farias de França** pela ajuda e pela alegria constante que tornaram os dias e noites mais leves no laboratório.

Ao **PG (Pequeno Grupo)** que partilham comigo a fé cristã, que ouviram e intercederam por mim. E, certa estou que TUDO aconteceu segundo a vontade e permissão d’Aquele a quem tudo é submisso.

Aos técnicos dos laboratórios, da UFT e UNISO, pela eficiência.

Ao **Instituto Butantan** na pessoa da Profa. Dr^a **Marisa Maria Teixeira Rocha** que tornou possível parte dos experimentos com os venenos.

À **Universidade Federal do Tocantins (UFT)** por oportunizar o aprendizado.

À **Universidade de Sorocaba (UNISO)**, representada pelo Professor Dr. **José Martins de Oliveira Junior**, Pro-Reitor em Pós-Graduação, Pesquisa Extensão e Inovação que mais uma vez consentiu meu estágio e livre acesso aos laboratórios.

Parece piegas, mas não é. De Antoine de Saint-Exupéry: “Cada um que passa em nossa vida *não* vai *só*, nem *nos* deixa *sós*; leva um *pouco de nós* mesmos, deixa um *pouco de si* mesmo”. A vida é assim, a ciência é assim.

Não se faz ciência sozinho. Basta abrir os milhares de trabalhos publicados e logo vem uma lista, geralmente imensa, nos agradecimentos.

Esta tese não foi diferente, é a prova de que eu estava cercada de pessoas que não poupam esforços para ajudar, servir, ser útil.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA!!!!

Fonte de Financiamento

Este trabalho foi financiado pela CAPES, Edital PROCAD 2013 projeto Fortalecimento de programas de Pós-Graduação, na Amazônia e na Extra-Amazônia, com ênfase em envenenamentos ofídicos: uma estratégia de formação de pessoal e interdisciplinaridade; e bolsa de doutorado de Demanda Social (PGCiamb). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Tocantins/FAPT (Edital PPSUS 01/2018, Convênio 835798/2016) e do Estado de São Paulo/FAPESP (2004/09705-8; 2007/53883-6; 2008/50669-6; 2015/01420-9). E pela bolsa de Demanda Social disponibilizada pela CAPES (2018/2020).

*“...Porque **nele** vivemos, e **nos** movemos, e **existimos**”.*
Atos 17:18

RESUMO

O acidente ofídico é considerado de interesse em saúde pública no Brasil, sendo o gênero botrópico responsável por cerca de 90% desses acidentes. O acidente botrópico ocasiona severas alterações locais e sistêmicas, que podem deixar graves sequelas ou mesmo levar o indivíduo a óbito. Os efeitos locais não são neutralizados pelo Antiveneno Comercial (AVC) e são agravados por fatores como distância e dificuldade de deslocamento para os locais de atendimento. Nesse contexto, o uso terapêutico de plantas medicinais, como *Jatropha elliptica*, é comum e estudos farmacológicos validaram seu uso tradicional para o acidente ofídico. Os estudos proteômicos dos venenos de serpentes demonstram particularidades quanto à composição e a relação com os sintomas causados. Tais particularidades influenciam no tratamento devido a diferenças na capacidade neutralizante do soro. O estudo da composição dos venenos de filhotes de *Bothrops moojeni* do cerrado (TO), considerou as variações para o sexo desses animais e evidenciou diferenças significativas entre ambos, demonstrando uma ampla e diversificada categoria de proteínas. O veneno dos FIL ♀ (filhotes fêmeas) apresentou DMC (Dose Mínima Coagulante) em 0,2 µg/mL de plasma equino e o dos FIL ♂ (filhotes machos) 0,4 µg/mL, sendo o veneno das fêmeas mais coagulante. O veneno dos FIL ♀ se destacou na atividade de serinoprotease (0,34±0,05 nmols), sendo superior à atividade do veneno dos FIL ♂ (0,26±0,03; p<0,001) e também foi mais letal. Contudo, esses venenos não diferiram nas atividades fosfolipásica e hemorrágica. Também foi avaliada a capacidade do pool de veneno (50 µg/mL) de *B. moojeni* adultos em bloquear a atividade da preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, através de técnica miográfica tradicional. O JeP (polvilho), obtido de modo artesanal de *J. elliptica*, foi tamisado e concentrações de 100 e 1000 µg/mL e foram testadas por três protocolos: a) pré-veneno: JeP por 15 min, seguidas pela adição de veneno; b) pós-veneno: veneno por 15 min antes da adição de JeP; e c) pré-incubação: mistura de veneno + JeP por 30 min antes da adição ao banho. Para os tratamentos pré-veneno e pós-veneno com JeP 100 µg/mL foram 100,9 ± 7,6 % e 97±6,1 %, respectivamente. O modelo de pré-incubação mostrou efeito semelhante (78,2±9,2 %) ao produzido pelo antiveneno botrópico comercial (80,2±14,1 %). Na mesma sequência de modelos, para JeP 1000 µg/mL os T50 foram de 88,1±7,7 %; 61,5±9,1 % e 86,5±8,9 %. O aumento de JeP para 1000 µg/mL (10X) foi insignificante para melhorar o T50 do veneno. Os resultados evidenciaram que o veneno de *Bothrops moojeni* induz bloqueio neuromuscular e pequenas quantidades do polvilho de *J. elliptica* foi eficiente em inverter esse efeito.

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*, Junção Neuromuscular. *Jatropha elliptica*. Polvilho.

ABSTRACT

FERREIRA-RODRIGUES, Sára Costa. **Study of the antiophidic property of *Jatropha elliptica* (Pohl.) Mull Arg.** 2020. 75p. PhD thesis in Environmental Sciences. Concentration area: Biodiversity and Natural Resources. Federal University of Tocantins - UFT. Palmas, Tocantins, 2020.

Ophidian accidents are a public health concern in Brazil with *Bothrops* genus responsible for about 90% of them resulting in severe local and systemic changes which can leave serious sequelae or even lead to death. The commercial antivenom is ineffective against the local effects and the distance and difficulty to access the service locations are aggravating. Medicinal plants as *Jatropha elliptica* to treat snakebites is a valuable resource face to the biodiversity of Brazil. Proteomic studies of snake venoms demonstrate particularities regarding the composition and the relationship with the symptoms caused. Such particularities influence the treatment due to differences in the neutralizing capacity of the serum. The study of the composition of *Bothrops moojeni* puppies from the cerrado (TO) took into account the variations for the sex of these animals and evidenced significant differences between both, demonstrating a wide and diversified category of proteins. The venom of FIL ♀ (female puppies) presented MCD (Minimum Coagulant Dose) in 0.2 µg / mL of equine plasma and that of FIL ♂ (male puppies) 0.4 µg / mL, the female venom being the most coagulant. The venom of FIL ♀ stood out in the serine protease activity (0.34 ± 0.05 nmol), being superior to the activity of the venom of FIL ♂ (0.26 ± 0.03 ; $p < 0.001$) and was also more lethal. However, these poisons did not differ in phospholipase and hemorrhage activities. The ability of the adult *B. moojeni* venom pool (50 µg / mL) to block the activity of the mice phrenic nerve diaphragm preparation was measured using a traditional myographic technique. The JeP (powder), obtained by hand from *J. elliptica*, was screened at concentrations of 100 and 1000 µg / mL and were tested by three protocols: a) pre-venom: JeP for 15 min, followed by the addition of poison; b) post-venom: poison for 15 min before adding JeP; and c) pre-incubation: a mixture of poison + JeP for 30 min before adding to the bath. For pre-venom and post-venom treatments with JeP 100 µg / mL, $100.9 \pm 7.6\%$ and $97 \pm 6.1\%$, respectively. The pre-incubation model showed a similar effect ($78.2 \pm 9.2\%$) to those produced by commercial bothropic antivenom ($80.2 \pm 14.1\%$). In the same sequence of models, for JeP 1000 µg / mL, the T50s were $88.1 \pm 7.7\%$; $61.5 \pm 9.1\%$, and $86.5 \pm 8.9\%$. The increase in JeP to 1000 µg / mL (10X) was negligible to improve the T50 of the poison. The results showed that *Bothrops moojeni* venom induces neuromuscular block and small amounts of the *J. elliptica* starch was efficient in reversing this effect.

Keywords: *Bothrops moojeni*, Neuromuscular junction. *Jatropha elliptica*. Flour.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I	pág
Figura 1: <i>Jathropha elliptica</i> localizada próxima a Barra da Aroeira, município de Santa Tereza do Tocantins.....	25
Capítulo II	
Figura 2. Eletroforese em gel SDS-PAGE (com B-mercaptoetanol) e análise densitométrica das bandas dos venenos de filhotes de <i>Bothrops moojeni</i> , do estado do Tocantins.....	39
Figura 3. Perfil cromatográfico (HPLC) dos venenos de <i>Bothrops moojeni</i> , do estado do Tocantins.....	41
Figura 4. Zimografia em SDS-Page do veneno dos filhotes de <i>Bothrops moojeni</i> , do estado do Tocantins.....	42
Figura 5. Atividade de serinoprotease do veneno de filhotes de <i>Bothrops moojeni</i> do estado do Tocantins.....	43
Figura 6. Atividade de fosfolipase A ₂ do veneno de filhotes de <i>Bothrops moojeni</i> do estado do Tocantins.....	43
Figura 7. Atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> , do estado do Tocantins.....	44
Capítulo III	
Figura 8. Eletroforese em SDS-Page.....	55
Figura 9. Registro miográfico representativo do bloqueio neuromuscular induzido pelo Pool/TO (50 µg/mL).....	55
Figura 10. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, estímulo indireto. Curva concentração-resposta do polvilho (JeP 100, 200 e 1000 µg/mL).....	57
Figura 11. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, estímulo indireto. Tempo de bloqueio 50% (T50, min) de cada modelo experimental 100 ou 1000 µg/mL of JeP, como a seguir: pré-veneno, pós-veneno e pré-incubação com o soro antiofídico (AVC).....	58

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Compostos identificados e isolados de <i>Jatropha elliptica</i>	28
--	----

Capítulo II

Tabela 2. Procedência e características das serpentes utilizadas para extração do veneno.....	35
--	----

Tabela 3. Análise da cromatografia.....	40
--	----

Tabela 4. Toxicidade do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (135 µg/animal), avaliado após 24 e 48 horas do envenenamento.....	44
---	----

Capítulo III

Tabela 5. Protocolos e número de experimentos.....	54
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.	<i>Bothrops</i>
Bmooj	<i>Bothrops moojeni</i>
Bjssu	<i>Bothrops jararacussu</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro padrão da média
I.A.	Índice Afrosimétrico
i.p.	Intraperitoneal
<i>J. elliptica</i>	<i>J. elliptica</i>
<i>L. muta</i>	<i>Lachesis muta</i>
mg	Miligrama (s)
µg	Micrograma (s)
min	Minuto (s)
µL	Microlitro (s)
mg	Miligrama (s)
PLA₂	Fosfolipase A ₂
NaCl	Cloreto de sódio
KCl	Cloreto de potássio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
n	Número de experimentos
i.pl.	Intraplantar
v.o.	Via oral
sp.	Espécie

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1 Venenos botrópicos.....	15
1.2 Quadro clínico.....	16
1.3 Principais proteínas e efeitos do envenenamento botrópico.....	17
1.4 Uso de plantas.....	18
1.5 <i>Bothrops moojeni</i>	20
1.6 Uso terapêutico de proteínas isoladas.....	21
2. OBJETIVOS: geral e específicos.....	22
3. METODOLOGIA e RESULTADOS: apresentados em forma de capítulos	
✓ Capítulo I: <i>Jatropha elliptica</i> (Pohl.) Müll. Arg. (Revisão).....	23
✓ Capítulo II: Variação na composição do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> filhotes, machos e fêmeas.....	33
✓ Capítulo III: Bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno da serpente <i>Bothrops moojeni</i> e o efeito do polvilho de <i>Jatropha elíptica</i>	50
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta uma fauna de serpentes composta por 75 espécies de interesse médico agregadas nas famílias Elapidae e Viperidae. Pertencente esta última o gênero das *Bothrops* (jararacas), responsável por cerca de 90% do número total de acidentes, o que também é reproduzido para o estado do Tocantins (SINAN, 2020).

O gênero *Bothrops* compreende pelo menos 50 espécies, com extrema diversificação morfológica e ecológica, que resulta em variações na composição do veneno (da SILVA e RODRIGUES, 2008; BARBO et al., 2012; 2016; CARRASCO et al., 2016).

Essas variações podem ser resultado da ação de diversos fatores e interações (AIRD et al., 2015; WONG et al., 2009). Nesse sentido, a composição dos venenos tem sido estudada por ferramentas proteômicas referidas como “omics” com o objetivo de entender melhor como essas variações influenciam na sua composição (SUNAGAR et al., 2016; CALVETE, 2017; UTKIN, 2015).

Essas pesquisas contribuíram de forma fundamental para o conhecimento que se tem hoje a respeito da composição do veneno como a história evolutiva, a identificação de toxinas que são potenciais candidatas para o desenvolvimento de ferramentas biológicas ou drogas terapêuticas e possibilitou relacionar a composição do veneno com os sintomas clínicos do envenenamento (BRAHMA et al., 2015; CAO et al., 2013; de OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016; YIN et al., 2016).

É considerável o avanço alcançado no conhecimento da composição dos venenos de serpentes, porém diversos mecanismos de ação dos componentes envolvidos nos efeitos locais ainda não estão bem compreendidos. Devido a gravidade, os efeitos do envenenamento por serpentes se constituem em um desafio de saúde pública (GUTIERREZ, 2012; MAMED et al., 2016).

1.2 Venenos botrópicos

Os venenos das serpentes são produzidos em glândulas exócrinas especializadas, são modelos relevantes para estudos da síntese protéica, secreção e o armazenamento de componentes potencialmente nocivos. São constituídos por uma mistura complexa de proteínas e peptídeos, que representam 90% do peso seco do veneno, auxiliam na captura e digestão dos alimentos, e constitui um mecanismo de defesa (DE LUCCA et al., 1974; SERRANO et al., 2005; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2015). Portanto, várias proteínas são tóxicas e a

principal função é imobilizar, paralisar ou deixar as presas mais fracas para matá-las e ingeri-las de maneira segura (KOCHVA, 1987; QUEIROZ et al., 2008; RICHARDS; BARLOW; WÜSTER, 2012).

Os estudos dos proteomas dos venenos de serpentes mostram que há diferenças em sua composição (CHIPPAUX et al, 1991), que são influenciados por fatores ambientais e ecológicos (ZELANIS et al., 2010).

Se comparado com venenos de outros grupos de animais, possui complexidade em suas atividades tanto bioquímicas quanto farmacológicas, e as variações ocorrem em vários níveis como família, gênero, espécie, população e entre indivíduos de forma intraespecífica, representada por variações ontogenéticas (CHIPPAUX, 1991; SALDARRIAGA et al., 2003; GUÉRCIO et al., 2006; ZELANIS et al., 2010). Essa variabilidade na composição pode resultar em diferentes quadros clínicos de envenenamento (CASEWELL et al, 2014; GONÇALVES-MACHADO et al, 2015; CARRASCO et al., 2016; DURBAN et al, 2017; CALVETE, 2017).

1.2 Quadro clínico

O envenenamento botrópico é caracterizado por graves danos locais causados pela ação tóxica de componentes do veneno que causam e agravam a inflamação (MAMED et al., 2016).

Alguns fatores determinam o quadro clínico desenvolvido pela vítima. A quantidade de veneno inoculado, a região da picada, a idade e o tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico podem favorecer a complicação do acidente (ALMEIDA et al., 2016).

As alterações mais proeminentes no gênero *Bothrops* são caracterizadas pelos efeitos locais, sistêmicos ou ambos (WARRELL, 2010), com mortalidade abaixo de 1% dos casos tratados. No entanto, sequelas anatômicas locais e funcionais, devido à necrose dos tecidos e infecção secundária são comuns. Na maioria dos casos, a insuficiência renal, que pode ocorrer, é reversível (CAMPOS et al., 1999).

Os efeitos locais são causados pelos vários componentes presentes no veneno, como enzimas e toxinas que agem de forma conjunta, estas se instalam precocemente e de forma progressiva, podendo causar a amputação ou mesmo a morte do acidentado (BARRAVIEIRA et al., 1994; RIBEIRO et al 1998; LOMONTE et al., 1990; PINHO e PEREIRA, 2001; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989, 2003; FONSECA et al., 2004).

Atualmente o tratamento mais eficaz para pacientes de acidentes ofídicos, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2020), é a soroterapia, mas esse procedimento tem sido eficiente em neutralizar os efeitos sistêmicos causados pelo envenenamento, não os efeitos

locais (NADUR-ANDRADE et al., 2012). Estudo de Gutiérrez et al. (2011) demonstra que, mesmo a soroterapia sendo eficaz, reduzindo a mortalidade e os efeitos sistêmicos dos acidentes ofídicos, os efeitos locais não neutralizados pelos antivenenos podem evoluir.

1.3 Principais proteínas e efeitos do envenenamento botrópico

Na família Viperidae as metaloproteínas, serinoproteases e fosfolipases são responsáveis pelas ações locais do envenenamento como hemorragias, ação inflamatória, lesões da pele, mionecroses dentre outros (COSTA e SANTOS, 2004; de OLIVEIRA et al., 2016; SALVADOR et al., 2013).

A atividade hemorrágica é uma das atividades mais evidentes (BJARNASSON e FOX, 1994). As metaloproteases possuem massa molecular entre 20 e 110 kDa, causam degradação do colágeno, bem como, de outros componentes da lâmina basal dos vasos capilares. Consequentemente, esses capilares são rompidos, ocorrendo equimose e sangramentos. A alteração do tempo de coagulação (TC) é resultado da atuação sobre fatores da cascata de coagulação e sobre a trombina (GUTIERREZ e CHAVES, 1980; FOX e SERRANO, 2008; OKAMOTO et al., 2014).

Outro componente importante do veneno são as enzimas fosfolipases A₂ (PLA₂). São proteínas de 14-18 kDa, abundantes nos venenos botrópicos, interferem severamente nas funções fisiológicas causando trombose e hemorragia, estão envolvidas em mecanismos de proliferação celular, quimiotração, contração do músculo liso e atividades microbiológicas. Algumas iniciam a agregação plaquetária, em contra partida outras inibem severamente esta atividade (KINI e EVANS, 1990; KINI, 2003, MORA et al., 2005 ; AMORIM et al., 2018).

As serinoproteases são abundantes nos venenos da família Viperidae e constitui cerca de 20% da totalidade de proteínas que formam o veneno, são caracterizadas com propriedades bioquímicas e estruturais, com massa molecular de 28 à 60 kDa. Estão ligadas às funções digestivas, ativação do sistema complemento, diferenciação celular e hemostasia. Não apresentam letalidade, mas certamente contribuem no efeito tóxico quando associadas a outras proteínas do veneno. Sua atuação está ligada diretamente na cascata de coagulação, por vezes, de forma não específica na degradação proteolítica, ou seletivamente por meio da ativação e inativação de fatores da coagulação, envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (BRAUD et al., 2000; CASTRO et al., 2004; OLIVEIRA et al. 2013).

1.4 Uso de plantas

Mesmo havendo um avanço importante no conhecimento da composição e atividade do veneno de serpentes, a compreensão dos efeitos locais causados por toxinas ofídicas ainda é limitada devido à complexidade que possuem. Em consequência, a neutralização dos danos locais causados pelo envenenamento botrópico, como já mencionado, continua ineficiente (QUEIROZ et al., 2008; ISBISTER, et al., 2009; GUTIÉRREZ, et al., 2010; GUTIÉRREZ, 2012; NADUR-ANDRADE et al., 2012).

Alternativas terapêuticas que minimizem os efeitos do envenenamento se tornaram importantes (FONSECA et al., 2004). O uso de extratos vegetais como antídotos de envenenamento é muito comum e, em muitas comunidades onde a soroterapia é de difícil acesso, apresentam-se como único recurso terapêutico (SOARES et al., 2005).

Em se tratando de plantas como recurso, as medicinais têm sido utilizadas em todo o mundo durante séculos para manter a saúde (GANIE et al., 2015). Por conseguinte, os últimos 200 anos testemunharam uma metamorfose substancial nos estudos e práticas na busca de princípios ativos naturais (DHAMI, 2013).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais é uma prática generalizada na medicina popular e o uso de plantas baseado no conhecimento tradicional, em sua maioria, é transmitido oralmente (MADEIRA e LIMA, 2015).

Segundo Moreira et al. (2002) o conhecimento sobre as plantas foi sendo adquirido e repassado através das gerações a partir de experiências individuais, e o que faz o homem utilizar as plantas como alternativa terapêutica é a perpetuação de informações valiosas, capazes de promover a cura dos seus próprios males.

A atribuição de sua sobrevivência, em meio as dificuldades enfrentadas, é dada ao meio ambiente. O alicerce deste conhecimento está nos resultados práticos acumulados ao longo do tempo e sobre base empírica, o que contribui para a solução dos problemas cotidianos. Quando se trata do uso medicinal das plantas, a população busca melhoria na qualidade de vida, também como tentativa de suprir as deficiências de assistência primária relacionadas à saúde, precariedade do sistema oficial ou então à distância para buscar atendimento médico (CASTRO e FERREIRA, 2001; COSTA e MAYWORM, 2011). Essa prática no Brasil é muito comum e resultante da forte influência cultural dos indígenas locais, miscigenadas às tradições da África e Europa, trazidas pelos colonizadores (MARTINS, 2000).

Estudos envolvendo plantas no Brasil são especialmente importantes pela rica biodiversidade do cerrado, que detém a maior diversidade de plantas do mundo e conhecimentos tradicionais abundantes. De forma geral, esta riqueza vem despertando interesse de comunidades científicas relacionadas ao estudo, conservação e utilização racional destes recursos (MARTINS, 2000; FUNARI e FERRO, 2005; SOUZA e FELFILI, 2006).

Várias plantas foram estudadas com a finalidade de comprovar seus efeitos sobre a ação do envenenamento de algumas espécies de *Bothrops* (ASSAFIM et al., 2011; FERRAZ et al., 2014; TRIBUIANI et al., 2014). O objetivo é usá-las no tratamento como adjuvante do Antiveneno Comercial recomendado (WHO, 2020; GOMES et al., 2016).

Como exemplo, citamos os estudos com *Jatropha molíssima* e *Hypericum laxiusculum* (Hypericaceae) testada contra os efeitos locais induzidos pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas* (ASSAFIM et al., 2011; GOMES et al., 2016) e *Jatropha elliptica* estudada para verificar sua ação antiofídica sobre o veneno de *Lachesis muta*, no que diz respeito à hemólise, hemorragia, coagulação e atividade proteolítica (DE PAULA et al., 2010).

As pesquisas científicas realizadas com *Jatropha elliptica* ratificam o potencial medicinal relatado popularmente (BRUM et al., 2006; LIMA et al., 2006; PESSOA et al., 1999, 2007). Também validaram sua atividade antiofídica do extrato etanólico liofilizado, evitando a evolução da paralisia em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos induzidas pelo veneno de *B. jararacussu* e a atividade anti-inflamatória sobre o edema de pata e a migração de neutrófilos (FERREIRA-RODRIGUES et al., 2016).

Informações a respeito do uso do pó (polvilho) obtido dos rizomas de *J. elliptica*, administrado em pequenas quantidades, indicam que também é eficiente no tratamento do envenenamento ofídico (SANTOS et al., 2006). Não havendo estudos a respeito da atividade antiofídica do polvilho de *J. elliptica*, nos propomos investigar.

Portanto, as plantas medicinais provaram seu valor como fonte de moléculas com potencial terapêutico e ainda hoje, representam uma associação importante para a identificação de novos fármacos com a possibilidade de uma visão abrangente das abordagens usadas. As tendências de pesquisa indicam claramente que os produtos naturais estarão entre as fontes mais importantes de novos medicamentos também no futuro (ATANASOV et al., 2015).

1.5 *Bothrops moojeni*

É uma serpente peçonhenta conhecida por malha-de-sapo, jararaca ou caiçaca, com porte médio de aproximadamente 1,80m de comprimento total e hábito terrícola, com atividade, preferencialmente noturna. É amplamente distribuída pelo cerrado com reprodução vivípara, capaz de se adaptar a ambientes diversos (FREITAS, 2003; CAMPBELL e LAMAR, 2004; BERNARDE, 2012).

A peçonha de *Bothrops moojeni* tem sido muito estudada e de forma geral, seu veneno é semelhante aos venenos de outras espécies do gênero em relação à composição (ASSAKURA et al., 1985; NADUR-ANDRADE et al., 2012; SILVEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2015), atividades proteolítica, coagulante e hemorrágica (CARDOSO et al., 2003). A atividade proteolítica em *moojeni* é mais intensa quando comparada com outras espécies botrópicas (ASSAKURA et al., 1985; CAMPOS et al., 2013).

O estudo do transcriptoma da glândula de veneno de *Bothrops moojeni*, identificou 20 classes de componentes, dentre as quais as metaloproteases foram as mais expressas, seguidas das serinoproteases e fosfolipases e sequências de aminoácidos que ainda não haviam sido relatadas para esse veneno (AMORIM et al., 2017).

Os estudos que contemplam as atividades do veneno de *B. moojeni* ratificam a mudança que ocorre na composição do proteoma relatada na literatura, inclusive quando avaliada idade e gênero da espécie (FURTADO et al., 2006; AMORIM et al., 2018).

Nesse sentido, a abundância relativa e a presença dos componentes nos venenos têm relação com os amplos efeitos farmacológicos e com a toxicidade do veneno (BRAUD et al., 2000; CASTRO et al., 2004; SILVEIRA et al., 2013), como os efeitos locais mais potentes de edema, hiperagelsia e miotoxicidade induzidos pelo veneno de *B. moojeni*, em relação ao veneno de *B. alternatus*. Os resultados também indicaram que metaloproteases, e fosfolipases A₂ tem um papel central no dano local, incluindo a participação de serinoproteases (MAMED et al., 2016).

O veneno de *Bothrops moojeni* jovens apresenta maior atividade pró-coagulante (ativação de fator X e protrombina) e menor atividade inflamatória local, em relação às serpentes adultas (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003). Já o trabalho de Amorim et al. (2018) verificou que fêmeas de *B. moojeni* possuem maior quantidade de L-aminoácido oxidase e possivelmente esse aumento pode ser responsável pela maior citotoxicidade observada.

Apesar dos danos e consequências advindas do envenenamento por serpentes, no caso *B. moojeni*, serem notórios como os demonstrados aqui nessa revisão, muitas moléculas

presentes no veneno são relevantes do ponto de vista médico e científico (SALVADOR et al., 2013).

1.6 Uso terapêutico de proteínas isoladas

O homem tem buscado benefício usando recurso do ambiente a seu favor, inclusive do veneno de serpente, e, nesse sentido, os estudos farmacológico, bioquímico e tóxico têm revelado moléculas promissoras na terapêutica.

De forma geral, os venenos são fontes ricas em toxinas com grande potencial terapêutico e biotecnológico e as abordagens ômicas possibilitaram a identificação de componentes bioativos no veneno (AMORIM et al., 2017).

Uma serinoprotease denominada BmooSP foi isolada do veneno de *B. moojeni*. Os resultados obtidos por de Oliveira et al. (2016) sugerem o uso terapêutico desta enzima como agente antitrombótico. Essa enzima diminui o nível de fibrinogênio plasmático, a viscosidade do sangue melhorando a circulação sanguínea. Outra possibilidade é o uso de BmooSP para substituir suturas tradicionais em pequena cirurgia, pela capacidade que tem de formar cola de fibrina resistente.

A metaloproteinase moojenina isolada com cerca de 45 kDa (peso molecular) tornou o sangue de camundongos não coagulável, quando administrada por via intraperitoneal. Essa metaloproteinase pode ser de interesse médico devido à sua atividade anticoagulante (de MORAIS et al., 2012). Outras proteínas foram isoladas, a saber fosfolipase de 13,8 kDa capaz de inibir a agregação plaquetária e com efeito bactericida (SILVEIRA et al., 2013), serinoprotease de 32 e 35 kDa com capacidade de formar coágulos solúveis destacando sua aplicação clínica como desfibrinante (OLIVEIRA et al., 2013).

Não cabe aqui esgotar o assunto, mas mostrar que a atividade proteolítica do veneno de *B. moojeni*, com efeitos locais ao nível do sistema circulatório, são responsáveis pelos distúrbios hemostáticos causados pelo envenenamento (FRANÇA e MÁLAQUE, 2003) e são relevantes. E que a caracterização do conteúdo proteico do veneno dessas serpentes apresenta benefícios importantes para a pesquisa básica, para o diagnóstico clínico, o desenvolvimento de novas ferramentas de pesquisa e drogas com potencial aplicação terapêutica, ainda, como estratégias para a produção de soros antiofídicos eficazes (SANZ et al., 2006; MODAHL; DOLEY; KINI, 2010).

O conhecimento interespecífico da composição do veneno de *B. moojeni* pode ajudar a compreender os sintomas no envenenamento. E também, a produzir antivenenos mais

específicos, já que os estudos desta espécie, oriundas do Tocantins, são escassos e não abordam a variação sexual entre filhotes e adultos.

Portanto, nossa proposta foi caracterizar o veneno de filhotes fêmeas e machos de *Bothrops moojeni*, e validar a ação antiofídica de *Jatropha elliptica* sobre a junção neuromuscular.

2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o veneno de *Bothrops moojeni* e validar a ação antiofídica de *Jatropha elliptica* sobre a junção neuromuscular.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o papel relatado pela literatura, para o uso da batata de tiú (*Jatropha elliptica*); **Capítulo I**
- Caracterizar o veneno de *Bothrops moojeni* filhotes, machos e fêmeas; **Capítulo II**
- Verificar a capacidade do polvilho da batata de *Jatropha elliptica* em inibir o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *Bothrops moojeni*; **Capítulo III**

Bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno da serpente *Bothrops moojeni* e o efeito do polvilho de *Jathropa elliptica* (Pohl.) Müll. Arg.

1 Introdução

No Brasil, dentre as serpentes de interesse médico o gênero *Bothrops* (Viperidae) se destaca pela relevância dos acidentes, sendo esse responsável por 90% das notificações no Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN, 2020).

O Estado do Tocantins mantém o padrão epidemiológico nacional para o acidente ofídico, com a maioria dos acidentes notificados para o gênero botrópico, predominando acidentes para trabalhadores da área rural, sendo os membros inferiores os mais acometidos (LEOBAS et al., 2016; QUEIRÓS, 2020, no **prelo**; SINAN, 2020). Na área rural, os acidentes remetem ao agravante relacionado ao tempo de atendimento, pois a distância e dificuldade de deslocamento aumentam o tempo para o início do tratamento, um fator de risco para complicações locais e sistêmicas (FEITOSA et al., 2015; LEOBAS et al., 2016; CÂMARA et al., 2020).

Os pacientes tratados na primeira hora pós-acidente, no Estado, representaram 24% das notificações (1640 acidentes botrópicos), percentual inferior ao observado para o Brasil (27% dos acidentes botrópicos), para o período de 2010 a 2019 (SINAN, 2020).

A gravidade do acidente botrópico é marcada por intensas reações sistêmicas e locais, desencadeadas por vários componentes presentes no veneno, como fosfolipases, metaloproteases e serinoproteases. As principais alterações sistêmicas são observadas na hemostasia e as alterações locais desencadeiam dor, inflamação e destruição do tecido no membro acidentado, o que pode levar à amputação ou morte (BARRAVIEIRA et al., 1994; RIBEIRO et al., 1998; PINHO; PEREIRA, 2001; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989).

Alguns autores demonstraram o potencial dessas classes de proteínas identificadas em espécies de *B. moojeni* como anticoagulante, coagulante, bactericida e na indução de pronunciado efeito local não neutralizado pelo antiveneno (MORAES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; SALVADOR et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013).

O tratamento para o envenenamento ofídico tem sido a administração de antiveneno, o que melhora a resposta imunológica, reduz a mortalidade e neutraliza os sintomas clínicos

desencadeados pelo envenenamento (ALMEIDA et al., 2012; OMS, 2020). No entanto, os estudos demonstram que a eficácia do tratamento tem relação com o tempo entre o acidente e o início da administração do antiveneno, pois compromete a recuperação do paciente (GUTIÉRREZ et al., 2011; ESTEVÃO-COSTA et al., 2016; BORGES et al., 2018).

Assim, a busca por alternativas contra os efeitos do envenenamento por serpentes torna-se uma necessidade (FONSECA et al., 2004), principalmente para as populações que moram distantes dos centros de atendimento. Nesse sentido, a população muitas vezes faz uso de plantas medicinais como alternativa para minimizar as deficiências de assistência primária relacionadas à saúde, o que inclui o ofidismo (CASTRO e FERREIRA, 2001; SOARES et al., 2005; COSTA e MAYWORM, 2011; MARTINS et al., 2000).

As plantas capazes de neutralizar os efeitos de venenos ofídicos tornam-se reconhecidas, pois agregam ao valor medicinal, aspectos que contribuem para sua preservação (MORS, 2000), e podem ter seu potencial sugerido como adjuvante no tratamento dos acidentes por serpentes (GOMES et al., 2016). Devido à relevância dos efeitos causados pelo envenenamento botrópico, algumas espécies estão sendo estudadas para comprovar o uso popular sobre a atividade antiofídica (ASSAFIM et al., 2011; FERRAZ et al., 2014; TRIBUIANI et al., 2014), incluindo a *Jatropha elliptica* (Pohl.) Müll. Arg. (FERREIRA-RODRIGUES et al., 2016).

Característica do cerrado brasileiro (CORDEIRO e SECCO, 2015), *Jatropha elliptica* é utilizada como fortificante (VAN DER BERG e SILVA, 1988) e no tratamento de doenças inflamatórias, como purgativo, no tratamento do umbigo do recém-nascido e acidentes por serpentes (VAN DER BERG e SILVA, 1988; LIMA et al., 2006; SILVA et al., 2010; YAZBEK et al., 2016).

As pesquisas científicas realizadas com essa planta não só ratificam o potencial medicinal relatado popularmente, como também validaram atividades como citotóxica, anti-inflamatória e antitumoral *in vivo*, bactericida e antiofídica, evitando a evolução da paralisia em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos induzidas pelo veneno de *B. jararacussu* (BRUM et al., 2006; LIMA et al., 2006; PESSOA et al., 1999, 2007; FERREIRA-RODRIGUES et al., 2016). Contudo, estudo etnobotânico relata ainda, que o emprego do pó (polvilho) obtido dos rizomas de *J. elliptica*, administrado oralmente e em pequenas quantidades, também é eficiente no tratamento do envenenamento ofídico (SANTOS et al., 2006).

No Tocantins a serpente de interesse médico mais incidente é a *Bothrops moojeni* (SILVA, 2017). No entanto, não há estudos que avaliem a toxicidade desse veneno sobre a junção neuromuscular, tampouco para espécimes do cerrado Tocantinense ou para avaliar o

potencial antiofídico do polvilho dessa planta. Para suprir essa lacuna, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do veneno de *Bothrops moojeni* (Pool/TO) sobre a atividade neuromuscular e verificar a capacidade do polvilho de *J. elliptica* (JeP) em bloqueá-lo.

2 Material e métodos

2.1 Obtenção de rizomas da planta

A coleta de rizomas de *Jatropha elliptica* (Localização: S 10° 19.207' e W 047° 47,954') foi realizada em 2019, de acordo com o descrito por Ferreira-Rodrigues et al. (2016), no município de Santa Tereza (TO). A planta foi identificada de acordo com as Normas Internacionais de Classificação Botânica e comparada às exsicatas depositadas no herbário do Tocantins, da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus de Porto Nacional (Registro n. 10.681).

2.2 Obtenção do polvilho de *Jatropha elliptica* (JeP)

O polvilho foi obtido de modo artesanal. Os rizomas (1.815kg) da planta foram lavados e ralados em um ralo convencional, adicionando água, peneirado e colocado para decantar. Após a decantação, o sobrenadante foi removido e o restante seco à temperatura ambiente e posteriormente tamisado em peneira para análise granulométrica Granutest (Bertel Metalúgica Ltda.), tyler 80 (0,180 mm). O rendimento de polvilho foi de 124,7g. O JeP não se solubilizou em dimetil sulfoxido e nem em polietilenoglicol 400 (PEG 400), recomendados para uso em preparação neuromuscular (CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2008), razão pela qual optou-se pela diluição em Tyrode e ultrasonicação, por 10 minutos, antes da adição ao banho.

2.3 Obtenção do veneno de *Bothrops moojeni*

Amostras da primeira extração de veneno bruto de *Bothrops moojeni* foram obtidas de seis serpentes. Os animais foram coletados em áreas rurais dos municípios de Araguaína (duas fêmeas), Palmas (um macho e duas fêmeas) e Santa Rosa (uma fêmea), no estado do Tocantins, nos anos de 2016 e 2017. A captura dos animais recebeu a autorização científica nº 52416-1 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). O procedimento seguiu a Instrução Normativa nº 03/2014 e o material biológico foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do conhecimento Tradicional Associado (SisGen nº AC170C). O veneno (Pool/TO) foi coletado antes da primeira alimentação em cativeiro,

lioofilizados e armazenados a -20°C. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Herpetologia-IB do Instituto Butantan-SP, certificado pelo Dr. Sávio Stefanini.

2.4 Eletroforese SDS-PAGE

O perfil proteico do veneno foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). Utilizou-se uma concentração de 4 % no gel de aplicação e 10 % no de corrida (200v; 40mA e 20W). As amostras de veneno (10 µg) foram aplicadas na presença de β-mercaptoetanol e paralelamente foi utilizado um padrão de massa molecular de 10 a 250 kD, Dual Color Precision Plus (Bio Rad). O gel de eletroforese foi corado com Comassie-Bio Rad.

2.5 Ensaios de neutralização do veneno

2.5.1 Antiveneno Botrópico Comercial (ABC)

O antiveneno botrópico (ABC) foi doado pelo Instituto Butantan e os experimentos foram realizados seguindo as doses recomendadas na bula do ABC (Lote 180187, Fab. 03/2018, validade 06/2021), a saber: cada mL neutraliza 5 mg de veneno de referência *B. jararaca*.

2.5.2 Animais utilizados e condições experimentais

Camundongos machos *Mus musculus* Swiss (25-30g) foram adquiridos da Anilab (Animais de Laboratório, Paulínia, SP, Brasil), mantidos em câmaras com exaustão e ventilação apropriada (sistema de microventilação ambiental, Smaflex®), com temperatura controlada (25 ± 3 °C) em ciclos claro-escuro de 12 horas, controlados por timer, onde receberam ração e água *ad libitum* no biotério da Universidade de Sorocaba/SP, seguindo as Normas de Bem-estar Animal do COBEA, com projeto aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais da mesma instituição (Parecer CEUA 163/2019).

2.5.3 Preparação nervo frênico-diafragma (PND) de camundongos

A preparação nervo frênico-diafragma de camundongos foi isolada após a anestesia dos animais com halotano (Cristália, Brasil) e mortos por exsanguinação de acordo com Bülgring (1946) modificado para camundongos. A preparação biológica foi cuidadosamente colocada em cuba com capacidade para 5 mL contendo solução de Tyrode e presa através dos músculos da costela por ganchos existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37 °C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂). Uma tensão de 5 g/cm foi aplicada por meio de um fio preso à porção tendinosa. Após registro em condições controle

durante 15 minutos de estabilização da preparação, foram realizados os protocolos farmacológicos e registro miográfico de acordo com Farrapo et al. (2011).

Uma curva de concentração-resposta de polvilho foi realizada usando 100 µg/mL (n=6), 200 µg/mL (n=5) e 1000 µg/mL (n=10). A solução nutritiva de Tyrode representou a condição controle. As concentrações de JeP 100 e 1000 µg/mL foram posteriormente analisadas com 50 µg/mL de veneno de *B. moojeni* (n=9), usando três modelos (Tab. 5).

Tabela 5. Protocolos e número de experimentos

Modelos	JeP (100 µg/mL)	JeP (1000 µg/mL)
Pré-incubação (30 min, antes de adicionar ao banho de órgãos): <i>Pool</i> //TO + JeP* ou <i>Pool</i> //TO + ABC*	n=7	n=7
PréV: JeP adicionado 15 min antes do veneno	n=9	n=13
PósV: JeP adicionado após 15 min de veneno	n=8	n=6

*JeP, polvilho obtido de rizomas de *Jatropha elliptica*

*ABC, Antiveneno Botrópico Comercial

2.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média±erro padrão da média e a significância foi determinada pelo teste não pareado t-Student. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$, através do software Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

3. Resultados e Discussão

O perfil das proteínas do veneno das serpentes de *Bothrops moojeni* (em SDS PAGE 10%), está apresentado na figura 8. As proteínas expressas em maior intensidade, no gel, foram aquelas com massa molecular em torno de 10, 20 e 45 kDa. Destaca-se a importância de estudar a composição dos venenos, pois os constituintes influenciam diferentemente nos efeitos do envenenamento e, conseqüentemente, no tratamento necessário (CASEWELL et al., 2014).

Os valores do padrão molecular permitiram inferir que a proteína com ~14 kDa pertence à classe das fosfolipases (CALGAROTTO et al., 2008), e a de ~20 kDa às metaloproteínas (MeSH, 2020). É possível ainda observar a presença de proteínas compreendidas entre 20 e 50 kDa, quase indetectáveis no gel, o que evidencia pouca expressividade das mesmas na amostra analisada do veneno, como as serinoproteases (~32 kDa) (BHAT et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016).

Proteínas em torno de 50 kDa expressas em venenos pertencem à classe de fatores hemorrágicos com intensa atividade proteolítica (CRISTINA et al., 2020), não tendo sido ainda descrito no veneno de *B. moojeni*.

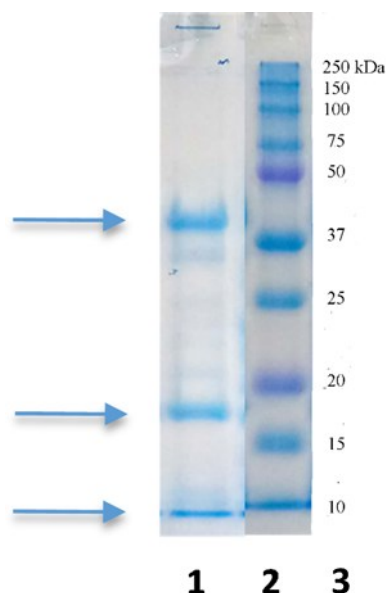


Figura 8. Eletroforese em SDS-Page. (1) *Pool/TO* (10µg). (2) padrões Dual Color Precision Plus (Bio Rad). (3) marcadores moleculares (kDa). As setas indicam bandas diferenciais expressas no *Pool/TO*. As proteínas foram coradas com Comassie-Bio Rad de acordo com as indicações do fabricante. *Pool/TO*, pool de venenos coletados de 6 serpentes *Bothrops moojeni*.

Não há estudos com o veneno de *B. moojeni* empregando o modelo experimental sobre a junção neuromuscular, ou seja, a preparação neuromuscular de mamíferos. A concentração eleita do veneno de 50 µg/mL foi baseada em estudos com outros venenos botrópicos, realizados no mesmo modelo (GALBIATTI, 2008; PUEBLA et al., 2010; CARDOSO, 2011; FERRAZ et al., 2014; TRIBUIANI et al., 2014; FERREIRA-RODRIGUES et al., 2016).

Na concentração de 50 µg/mL, o veneno causou 50% de bloqueio neuromuscular em um tempo de $T_{50} = 71,5 \pm 8,9$ min (n=9). A figura 9 ilustra um registro miográfico representativo do número de experimentos realizados com veneno de *B. moojeni* exposto à preparação neuromuscular durante 120 min.

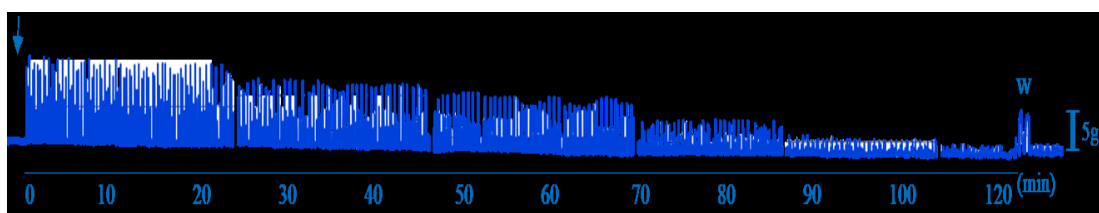


Figura 9. Registro miográfico representativo do bloqueio neuromuscular induzido pelo *Pool/TO* (50 µg/mL). A seta representa o momento da adição do veneno e o T_{50} de $71,5 \pm 8,9$ min. W, lavagem da preparação. *Pool/TO*, pool de venenos coletados de serpentes *B. moojeni* do estado do Tocantins.

Os venenos de serpentes apresentam-se ora mais, ora menos ativos, variando o tempo de bloqueio na junção neuromuscular (OLIVEIRA et al., 2019), um parâmetro que também depende da espécie, como por exemplo, o veneno de *B. jararacussu* que, na concentração de 40 µg/mL levou ao bloqueio de 50% num tempo de $56,2 \pm 8,3$ min (T50; n=4) (FERREIRA-RODRIGUES et al., 2016). Por outro lado, sabe-se que as diferenças na proporção e composição dos venenos influenciam na sua toxicidade conforme revelaram estudos proteômicos (CHIPPAUX et al., 1991; BRAUD et al., 2000; CASTRO et al., 2004; BRAHMA et al., 2015; DE OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016; YIN et al., 2016; AMORIM et al., 2018).

É importante salientar que o *Pool/TO* expressou pequena quantidade de serinoproteases (Fig. 1), o que pode explicar o T50% de bloqueio maior nesse *pool*. Outra possibilidade se relaciona ao efeito miotóxico local intenso causado por venenos botrópicos (NISHIMA et al., 2015), também observado na preparação neuromuscular (FERREIRA-RODRIGUES et al., 2016). Possivelmente a ação local mascare, reduza ou mesmo limite a ação neurotóxica do veneno botrópico.

Os venenos possuem toxinas que causam paralisia neuromuscular *in vitro*, e essa tem sido explicada pela presença de componentes que podem agir tanto pré-sinápticamente, bloqueando a liberação de acetilcolina (ACh), como pós sinápticamente, bloqueando seus receptores, ou ainda destruindo a arquitetura muscular esquelética, causando mionecrose (RODRIGUES et al., 2004). Portanto, nosso estudo demonstrou que o veneno de *B. moojeni* também causa importante bloqueio em preparações isoladas de camundongo, semelhante ao veneno de outras espécies de serpentes (GALBIATTI, 2008; PUEBLA et al., 2010; CARDOSO, 2011; FERRAZ et al., 2014; TRIBUIANI et al., 2014; FERREIRA-RODRIGUES et al., 2016). Porém são necessários estudos posteriores para elucidar os mecanismos envolvidos.

Popularmente algumas espécies de plantas são usadas para minimizar ou neutralizar os efeitos do envenenamento por serpentes devido à gravidade dos acidentes, e também ao tempo de acesso ao tratamento, principalmente nas áreas rurais, que são distantes de atendimento (MOURA et al., 2015).

Inclui-se nesse contexto a planta *Jatropha elliptica*, com ocorrência no cerrado brasileiro, conhecida como purga-de-lagarto, erva-de-teiú, batata-de-tiú dentre outros. É encontrada nos estados do Alagoas, Pernambuco, Mato Grosso, Goiás, Bahia e Tocantins e pode ser observada durante a transição da estação seca para chuvosa, tendo característica

sazonal (GOULART et al, 1993; SILVA, COELHO e SILVA, 1998; CORDEIRO e SECCO, 2015).

No que diz respeito ao uso medicinal, as informações etnobotânica e farmacológica revelam que nas regiões onde ocorre, sua raiz é muito utilizada na medicina popular como bactericida, depurativa, contra doenças venéreas, coceiras e para tratamento ofídico (VANDEN BERG e SILVA, 1988; DE LIMA et al., 2006; SANTOS et al., 2006; YAZBEK et al., 2016).

Para minimizar os efeitos do envenenamento por serpentes o uso tradicional de *J. elliptica* inclui o pó da raiz (polvilho) para o tratamento (SANTOS et al., 2006), na região do cerrado tocantinense, e é feito pela administração oral, em pequenas quantidades. Essas importantes informações guiou o presente estudo e utilizou o modelo experimental da junção neuromuscular, através de técnica miográfica, como ferramenta para a validação científica de extratos etnobotânicos de várias plantas contra venenos e toxinas (OSHIMA-FRANCO e DAL BELO, 2017). Para isso, obteve-se polvilho de forma artesanal, e por não haver estudos prévios sobre a resposta do polvilho, realizou-se uma curva concentração-resposta com 100, 200 e 1000 µg/mL de polvilho, neste modelo experimental (Fig. 10).

A figura 10 ilustra as concentrações de JeP 100 µg/mL (n=6); 200 µg/mL (n=5); e 1000 µg/mL (n=10), que foram adicionadas à cuba contendo a preparação neuromuscular.

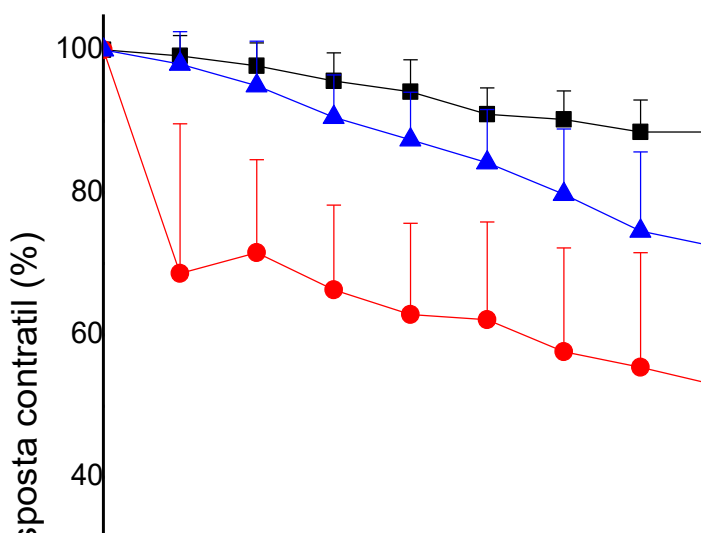


Figura 10. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, estímulo indireto. Curva concentração-resposta do polvilho (JeP 100, 200 e 1000 µg/mL). O número de experimentos é demonstrado na legenda da figura. Cada ponto representa a M±EPM. *p<0,05 comparativamente à concentração que causou a menor alteração basal.

A partir desses resultados duas concentrações foram selecionadas para os ensaios posteriores de neutralização, a de 100 µg/mL por ter sido a que provocou a menor alteração

basal da resposta contrátil e a de 1000 µg/mL ($p < 0,05$, comparada à menor concentração), por ser 10 vezes mais concentrada. Assim, a quantidade de JeP para se contrapor à ação do veneno pode ser testada.

Curiosamente a concentração de 200 µg/mL de JeP provocou um bloqueio neuromuscular mais acentuado que a de 1000 µg/mL, o que pode estar relacionado ao procedimento técnico, pois neste *set* de experimentos o polvilho não fora sonicado, o que pode ter influenciado no resultado.

Os resultados obtidos com o polvilho JeP contra o bloqueio neuromuscular induzido pelo Pool/TO estão mostrados na figura 11, em relação ao tempo para bloquear 50% da resposta contrátil. Os tratamentos pré-veneno e pós-veneno com JeP 100 µg/mL foram estatisticamente significativos, aumentando o tempo para $100,9 \pm 7,6$ ($n=9$) e $97 \pm 6,1$ ($n=8$), respectivamente. Observou-se também que o aumento de JeP para 1000 µg/mL (10 vezes) foi insignificante para melhorar o T50 do veneno em todos os modelos experimentais. O modelo de pré-incubação mostrou efeito semelhante ao produzido pelo antiveneno comercial ($p > 0,05$), com ambas as concentrações de JeP, porém, sem diferença estatisticamente significativa, quando comparado ao veneno. Diferenças na capacidade protetora dos antivenenos contra certos efeitos dos venenos já foram relatadas na literatura (DA SILVA et al., 2007; ESTEVÃO-COSTA et al., 2016; GUTIERREZ, 2017).

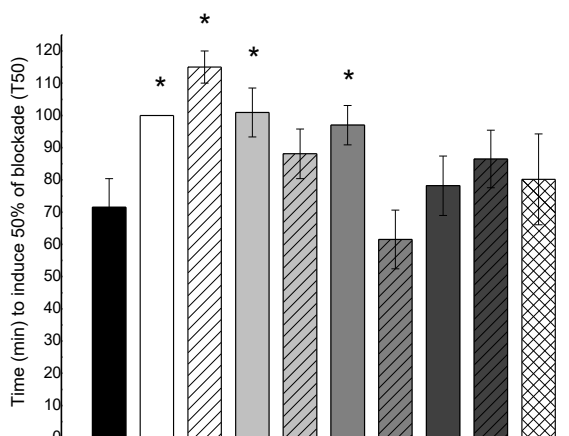


Figura 11. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, estímulo indireto. Tempo de bloqueio 50% (T50) de cada modelo experimental 100 ou 1000 µg/mL of JeP, como a seguir: ■ *B. moojeni* 50 µg/mL ($n=9$); □ JeP 100 µg/mL ($n=6$); ▨ JeP 1000 µg/mL ($n=10$); ▩ JeP 100 µg/mL 15 min, *B. moojeni* 50 µg/mL ($n=9$); ▤ JeP 1000 µg/mL 15 min, *B. moojeni* 50 µg/mL ($n=13$); ▥ *B. moojeni* 50 µg/mL 15 min, JeP 100 µg/mL ($n=8$); ▦ *B. moojeni* 50 µg/mL 15 min, JeP 1000 µg/mL ($n=6$); ▧ Pre-incubação *B. moojeni* 50 µg/mL + JeP 100 µg/mL ($n=7$); ▨ Pre-incubação *B. moojeni* 50 µg/mL + JeP 1000 µg/mL ($n=7$); ▩ Pre-incubação *B. moojeni* 50 µg/mL + antiveno ($n=7$). Observe que as diferenças estatisticamente significativas ($* p < 0,05$) foram demonstradas. Cada coluna representa $M \pm EPM$. *B. moojeni* representa Pool/TO, pool de venenos de *B. moojeni* de serpents d Tocantins, JeP, polvilho obtido dos rizomas de *J. elliptica*.

Várias espécies de plantas têm sido estudadas sob a perspectiva de que, se comprovada alguma atividade antiofídica, são possibilidades de adjuvantes ao antiveneno comercial, tratamento eficaz recomendado oficialmente no envenenamento ofídico (WHO, 2020; GOMES et al, 2016). Como exemplos, têm se os estudos com a planta *Hypericum laxiusculum* (Hypericaceae) contra os efeitos locais do veneno de *Bothrops jararaca* (ASSAFIM et al., 2011) e *Jatropha molissima* contra efeitos locais induzidos pelos venenos de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops jararaca* (GOMES et al., 2016).

Portanto, a validação do conhecimento tradicional assume cada vez mais importância no meio científico, fazendo o uso de protocolos que contribuam para indicação de fármacos que possa ser utilizado como coadjuvante à soroterapia convencional, não só para a região do cerrado, ocorrência da espécie estudada. Desse modo, o presente estudo representa um avanço na apuração da propriedade antiofídica de *J. elliptica* sobre a ação do veneno de *B. moojeni*, no que diz respeito ao uso do polvilho, ratificando a informação popular.

Contudo, outras formas de extração dos componentes do rizoma desta planta foram usadas para investigar a ação dos venenos de serpentes. O extrato aquoso foi eficaz sobre a ação do veneno de *Lachesis muta* no que diz respeito à hemólise, hemorragia, coagulação e atividade proteolítica (DE PAULA et al., 2010).

O extrato bruto etanólico também apresentou significativa atividade anti-inflamatória sobre os modelos clássicos de edema de pata e na migração de neutrófilos induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussu*. Na junção neuromuscular, o mesmo extrato evitou a evolução da paralisia, e a análise histológica confirmou o efeito protetor reduzindo o índice miotóxico (IM) ($p < 0,05$) em até três vezes, ou seja, reduziu os danos causado pelo veneno a saber, mionecrose, edema, ruptura da membrana e presença de células fantasmas. Esse efeito protetor foi atribuído aos compostos fenólicos, alcaloides e saponinas presentes no extrato (FERREIRA-RODRIGUES et al., 2016). Milad et al. (2014) afirmam a necessidade de estabelecer uma correlação entre a presença dos metabólitos secundários, seu efeito e o uso popular. Isso ressalta a relevância de aprofundar os estudos sobre a atividade biológica destas plantas.

A obtenção do polvilho de modo artesanal nos persuade a pensar que, durante o processamento por decantação, porções dos metabólitos secundários permaneçam impregnados, causando seu efeito protetor, e/ou que o carboidrato forneça energia para a célula responder mais efetivamente às ações do veneno. Os estudos de Bento et al. (2019a, b) confirmaram a presença de compostos fenólicos na farinha da batata teiú (12,67 mg eq ácido gálico 100 g⁻¹), com potencial antioxidante e recurso nutracêutico. Esses resultados contribuem

com nossa hipótese, contudo, novos estudos precisam ser realizados para elucidar o mecanismo protetor do polvilho.

De acordo com Moura et al. (2015) a busca por um antídoto proveniente de planta contra o envenenamento por serpentes tem sido longa. A fundamentação para indicar uma planta com potencial antiveneno é complexa (VILAR et al., 2005; MOURA et al., 2015), pois inexistente composto bioativo capaz de interagir com o antígeno do veneno como faz o anticorpo.

Entretanto, qualquer planta que atenua ou bloqueie a progressão de um evento do envenenamento deve ser valorizada, para estudos posteriores de prospecção, principalmente, aquelas oriundas do conhecimento tradicional, pelas conhecidas dificuldades de acesso à soroterapia, ou mesmo onde sua disponibilização é inexistente (SOARES et al., 2005).

4 Conclusão

Nosso estudo demonstrou que o veneno de *B. moojeni*, oriundo de espécimes naturais do cerrado tocantinense, causa importante bloqueio neuromuscular, em preparações isoladas de camundongo. Também comprovou experimentalmente, pela primeira vez, o efeito protetor do polvilho de *Jatropha elliptica* (JeP), em pequenas quantidades, imediatamente antes ou depois da adição do veneno de *Bothrops moojeni*.

Os resultados aqui apresentados ratificam a junção neuromuscular como importante ferramenta para o estudo de substâncias bioativas, levando em conta ainda, a alta incidência de acidentes botrópicos no Tocantins, bem como, a alta diversidade de espécies de plantas antiofídicas utilizadas pelas populações residentes no cerrado, que ainda carecem de validação científica.

Referências

- AIRD, S.D. ; KAISER, I.I. **Comparative studies on three rattlesnake toxins.** *Toxicon*, v. 23, n. 3, p. 361-374, 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90020-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90020-0)
- AIRD, S.D. et al.. Snake venoms are integrated systems, but abundant venom proteins evolve more rapidly. *BMC Genomics*, v. 16, p. 647, 2015.
- ALMEIDA, J.S.C.B. et al.. Antivenom serum therapy: treatment of adverse reactions. *Revista Médica de Minas Gerais*, v. 22, n. 8, p. S1-S48, 2012.
- ALMEIDA, M.M. et al. Revisão sistemática: as principais complicações do acidente botrópico. *Portal de revistas eletrônicas PUC Goiás*, v. 43, n. 1, p. 71-78, 2016.
- AMORIM, F.G. et al.. New findings from the first transcriptome of the *Bothrops moojeni* snake venom gland. *Toxicon*, v. 140, n. 15, p. 105-117, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.025>
- AMORIM, F.G. et al. Proteoetpeptidomic, Functional and Immunoreactivity Characterization of *Bothrops moojeni* Snake Venom: Influence of Snake Gender on Venom Composition. *Toxins*, v. 10, p. 177, 2018. DOI:10.3390/toxins10050177
- AÑEZ, L.M.M. et al.. Caracterização morfológica dos frutos, das sementes e do desenvolvimento das plântulas de *Jatropha elliptica* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Botânica*, v. 28, n.3, p.563-568, 2005.
- AÑEZ, R.B.S. 1999. O uso de plantas medicinais na Comunidade do Garcês (Cáceres, Mato Grosso). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. 1999.
- ANTUNES, T.C. et al.. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*, v. 56, n. 8, p.1443–1458, 2010.
- ASSAFIM, M. et al. *Hypericum brasiliense* plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom. *Journal Venom Research*, v. 2, p. 1-16, 2011.
- ASSAKURA, M.T. et al. **Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca).** *Toxicon*, v. 23, n. 4, p. 691-706, , 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90374-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90374-5)
- ATANASOV, A.G., et al.. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, n. 33, p. 1582–1614. 2015.
- BARATA, Lauro E. S.. Empirismo e ciência: fonte de novos fitomedicamentos. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 57, n. 4, 2005. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.phpscript=sci_arttext&pid=S000967252005000400002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 19 jan. 2019.
- BARBO, F.E. et al.. A new and threatened insular species of lancehead from Southeastern Brazil. *Herpetologica*, v. 68, p. 418–429, 2012.

BARBO, F.E. et al.. Another new and threatened species of lancehead genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae) from Ilha dos Franceses, Southeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 4097, p. 511–529, 2016.

BASTOS, R.A.A.; LOPES, A.M.C.. A Fitoterapia na Rede Básica de Saúde: o Olhar da Enfermagem. **Revista Brasileira de Ciências e Saúde**, v. 14, n. 2, p. 21-8, 2010.

BARRAVIEIRA, B.. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Biomédicas. 1994.

BENTO, J.A.C. et al.. Physicochemical, structural, and thermal properties of “batata-de-teiú” starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 332-340, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.208>

BERNARDE, P.S.; GOMES, J. O. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil. **Acta Amazônica**, v., 42, n. 1, p. 65–72, 2012.

BHAT, S.K. et al.. Serinoproteinases from *Bothrops* snake venom activates PI3K/Akt mediated angiogenesis. **Toxicon**, v. 124, p. 63–72, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.001>

BJARNASSON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snakes venos. **Pharmacol Ther**, vol. 62, p. 325-372, 1994.

BORDON, K.C.F. et al.. Bordonein-L, a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus terrificus* snake venom: isolation, preliminary characterization and enzyme stability. **Journal Venom Anim Toxins Includ Tropical Diseses** v. 21, n. 26, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0025-8>

BRAHMA, R.K. et al.. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. **Toxicon**, v. 93, p. 1-10, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.022>

BRASIL. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Ministério da Saúde, 2020.

BRAUD, S. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 851–859. 2000.

BRUM, R.L. et al.. Quantitative Determination of Jatrophone in “Cachaça” Prepared with *Jatropha elliptica*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 5, p. 754-757, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.54.754>

BRUM, R. L. et al. . *Jatropha elliptica* Muell. Arg. oils: Sources of delta-selinene. **Journal Essential Oil Res**, v. 9, p. 477-478, 1997.

CALDEIRA, C.; PARRÉ, J.L.. Diversificação agropecuária e desenvolvimento rural no bioma cerrado. **Revista Americana de Empreendedorismo e Inovação**, v. 2, n. 1, p. 344-359, 2020.

CALGAROTTO, A.K. et al.. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1509–1519, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1405484111>

CALVETE, J.J. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. **Biochemistry Journal**, v. 474, n. 460, p. 611-634, 2017.

CÂMARA, O.F. et al.. Ophidian envenomings in a region of Brazilian Western Amazon. **Journal Hum Growth Dev**, v. 30, n. 1, p. 120-128, 2020. DOI: <https://doi.org/10.7322/jhgd.v30.9958>

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of Latin América. Comstock Publishing/Cornell University Press, Ithaca. 870 p. 2004.

CAMPOS, J. A. et al. Acidentes por animais peçonhentos na infância. **Jornal de Pediatria**, v. 75, Supl.2, 1999.

CAMPOS, L.B., et al.. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops* spp. venoms. **Toxicon**, p. 1-10, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.063>

CAMPOS, R.A.S. et al.. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Médicas**, v.9, n.3, p.30-36, 2007.

CAO, Z. et al. The genome of *Mesobuthus martensii* reveals a unique adaptation model of arthropods. **Nature Commun**, n 4, p. 2602, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms3602>

CARDOSO, F. F.. Ação de compostos vegetais sobre a atividade da Piratoxina-I, isolada do veneno de *Bothrops pirajai*, em preparação neuromuscular de camundongos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Farmacologia).) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

CARDOSO, J. L. C et al.. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 540, 2003.

CARRASCO, P.A. et al.. Nomenclatural instability in the venomous snakes of the *Bothrops* complex: Implications in toxinology and public health. **Toxicon**, v. 119, p. 122-128, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.014>

CASEWELL, N.R. et al.. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. **PNAS**, v. 111, n. 25, p. 9205-9210, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1405484111>

CASTRO, H.C. et al.. Snake venom thrombin-like enzymes: From reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 843–856, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3325-z>

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.. A Dialética do conhecimento no Uso de Plantas Mediciniais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, n. 3, p. 19-21. 2001.

CHIPPAUX, J.P. et al.. Review Article: Snake Venom Variability: Methods of Study, I Results and Interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 1279-1303, 1991.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. et al.. Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. **Phytotherapy Resourch**, v. 22, n. 6, p. 784-790, 2008. DOI:

CORDEIRO, I.; SECCO, R.. *Jatropha* in Lista de Espécies da Flora do Brasil Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Growing Knowledge: an overview of Seed Plant diversity in **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

COSTA, E. P.; SANTOS, M. F.. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase-desintegrin, stimulates epithelial cell migration in vitro model. **Toxicon**, vol.44, p. 861-870, 2004.

COSTA, V.P.; MAYWORM, M. A.S.. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes - município de Extrema, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 282-292, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000300006>

COSTA, J.O. et al.. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombinlike enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, p. 1365–1377, 2010.

CRISTINA, R.T. et al.. Protein structure of the venom in nine species of snake: from bio-compounds to possible healing agents. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 1, p. 9001, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20199001>

da SILVA, et al.. **Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra maculosa***. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 283-291, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.024>

da SILVA, V.X., TREFAUT RODRIGUES, M.,. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, p. 45–90, 2008.

DE LA CRUZ-MOTA, M.G. 1997. Plantas medicinais utilizadas por raizeiros. Uma abordagem etnobotânica no contexto da saúde e da doença. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. 1997.

de LIMA, M.R.F. et al.. Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 105, p. 137-147, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.10.026>

DE LUCCA, F.L. et al.. Protein synthesis and morphological changes in the secretory epithelium of the venom gland of *Crotalus durissus terrificus* at different times after manual extraction of venom. **Toxicon**, v. 12, n. 4, p. 361-368, 1974.

de MORAIS et al.. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, v. 60, p. 1251–1258, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.017>

de OLIVEIRA, L.M.F. et al.. Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. **Toxicon** v. 76, 282–290, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.016>

OLIVEIRA, F. et al.. Biochemical and functional characterization of BmooSP, a new serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 111, p. 130-138, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.01.055>

DE PAULA, R.C. et al.. Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 2, p. 312, 2010.

DENNIS, E. A. et al.. Phospholipase A2Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 2011. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>

DEVAPPA, R.K. et al.. *Jatropha* Diterpenes: a Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 301–322, 2011.

Di Stasi, L.C. et al.. Meidicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n.1, p. 69-91, 2002.

DOS SANTOS, A.F.: SANT'ANA, A.E.G.. The molluscicidal activity of plants used in Brazilian folk medicine. **Phytomedicine**, v. 6, p. 431–438, 2000.

DHAMI, N.. Review Trends in Pharmacognosy: A modern science of natural medicines. **Journal of herbal medicine**, n. 3, p. 123–131. 2013.

DURBAN, J. et al.. Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts. **Jornal Proteome**, v. 16, p. 3370-3390, 2017.

ESTEVIÃO-COSTA, M.I. et al.. Neutralization of toxicological activities of medically relevant *Bothrops* snake venoms and relevant toxins by two polyvalent bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil. **Toxicon**, n. 122, p. 67-77, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.010>

FARRAPO, N.M. et al.. Inhibition of *Bothrops jararacussu* venom activities by *Plathymenia reticulata* Benth extracts. **Journal Venom Research**, n. 2, p. 52-58, 2011.

FEITOSA, E.S. et al.. Snakebites as a largely neglected problem in the Brazilian Amazon: highlights of the epidemiological trends in the State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 34-41, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0105-2013>

FERRAZ, M.C. et al.. An Isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is Active against the in Vitro Neuromuscular Paralysis of *Bothrops jararacuçu* Snake Venom and Bothropstoxin I, and Prevents Venom-Induced Myonecrosis. **Journal Molecules**, v. 19, p. 5790-5805, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19055790>

- FERREIRA-RODRIGUES, S.C. et al.. Anti-Inflammatory and Antithrombotic Properties of *Jatropha Elliptica*, a Plant from Brazilian Cerrado Biome. **Journal Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 4, p. 573-579, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2016.071>
- FINNEY, D.J.. Probit analysis. 3rd ed., **Cambridge University Press**: Cambridge, 488, 1971.
- FONSECA, F.V. et al. Extratos de *Curcuma longa* L. e *Kalanchoe brasiliensis* Camb. no tratamento local do envenenamento por *Bothrops alternatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 26-29. 2004.
- FOX, J.W., SERRANO, S.M.T.. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. The **FEBS Journal**, v. 275, p. 3016-3030, 2008.
- FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S.. Botropic accident, p. 72-86, 2003. In: Cardoso, J.L.C.; França O.S.F.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Haddad Jr, V. (Orgs). Venomous animals in Brazil: biology, clinical and therapeutic of accidents. **Sarvier**, São Paulo (in Portuguese).
- FREITAS, M.A.; Serpentes brasileiras. Lauro de Freitas: Malha-de-Sapo-Publicações, 120 p. 2003.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso Ético da Biodiversidade Brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 178-182, 2005.
- FURTADO, M.F.D. et al.. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, n. 48, p. 401-410. 2006.
- GALBIATTI, C.. Estudo das atividades neurotóxica e miotóxica de uma fosfolipase a2 básica isolada do veneno total de *Bothrops marajoensis*. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.
- GANIE, S.H. et al.. Authentication of medicinal plants by DNA markers. **Plant Gene**, n. 4, p. 83-99. 2015.
- GOMES, J.A. et al.. Aqueous Leaf Extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail Decreases Local Effects Induced by Bothropic Venom. **BioMed Research International**, v. 3, p. 13, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/6101742>
- GOMES, M.S.R et al. **Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 290-300, 2011.
- GONÇALVES-MACHADO, L. et al.. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian atlantic rainforest. **Journal Proteomics**, v. 135, p. 73-89, 2016.
- GOULART, M.O.F. et al.. Fitoconstituintes Químicos Isolados de *Jathropa elíptica*. Atribuição dos Deslocamentos Químicos dos Átomos de Carbono e Hidrogênio dos Diterpenos Jatrolonas A e B. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 95-100, 1993.

GUARIM NETO, G. 1996. **Plantas utilizadas na medicina popular do Estado de Mato Grosso**. Abeas, Brasília. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. 1987. 58 p.

GUARIN, N.; MORAIS, R. G., Recursos Medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um estudo Bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira**. v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

GUÉRCIO, R.A.P. et al.. Ontogenetic variation in the venoms proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science**, v. 4, p. 11, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: A Review. **Revista Memórias Instituto Butantan**, v. 51 n. 4, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. **Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom**. **Toxicon**, v. 23, n. 6, , p. 887-893, 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90380-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90380-0)

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? **Toxicon**, v. 55, p. 166–170, 2010.

GUTIÉRREZ, J.M. et al.. Antivenoms for snakebite envenomings. **Revista Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v. 10, p. 369-380, 2011.

GUTIÉRREZ, J.M. et al.. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. **Toxins**, v. 9, n. 5, p. 163, 2017.

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

GUTIERREZ, J.M.; CHAVES, F.. Proteolytic, hemorrhagic and myonecrotic effects on the venoms of Costa Rican snakes from the genera *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. **Toxicon**, vol. 18, p. 315-321, 1980.

HEUSSEN, C., DOWDLE, E.B.. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Biochemistry**, v. 102, n. 1, p. 196-202, 1980.

HIROTA, B. C. K et al.. Fitoquímica e atividades biológicas do gênero *Jatropha*: mini-revisão. **Visão Acadêmica**, v.11, n. 2, p. 103-111, 2010.

ISBISTER, G.K. et al. Human anti-snake venom IgG antibodies in a previously bitten snake-handler, but no protection against local envenoming. **Toxicon**, v. 55, p. 646-9, 2009.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução á taxonomia vegetal**. 7 ed. São Paulo: Nacional. 1985.

JÚNIOR, N. et al. Venom gland transcriptome analyses of two freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) from Brazil. **Scientific Reported**, n. 21935, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep21935>

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; et al.. Venom-related transcripts from *Bothrops jararaca* tissues provide novel molecular insights into the production and evolution of snake venom. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 3, p. 754-766, 2015.

KINI, R. M.; EVANS, H. J.. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, v. 28, p. 1387-1422, 1990.

KINI, R.M.. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

KNITTEL, P.S. et al.. Characterising the enzymatic profile of crude tentacle extracts from the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis* (Cnidaria: Hydrozoa). **Toxicon**, v. 119, p. 1-7, 2016.

KOCHVA, E.. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 65-106, 1987.

KUMAR, A.; SHARMA, S.. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 1, p. 1-10, 2008.

LABOURIAU, L.G. et al.. Nota sobre a germinação de sementes de plantas de cerrados em condições naturais. **Revista Brasileira de Biologia**, n. 23, p. 227-237, 1963.

LAEMMLI, U. K.. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v 227, p. 680–685, 1970.

LEOBAS, G.F. et al.. Acidentes por animais peçonhentos no estado do Tocantins: aspectos clínico-epidemiológicos. **Revista Desafios: Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 2, n. 2. p. 269-282, 2016. DOI: [10.20873/ufv.2359-3652.2016v2n2p269](https://doi.org/10.20873/ufv.2359-3652.2016v2n2p269)

LOMONTE, B. et al. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, n. 28, p. 1137-114. 1990.

LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, n. 7, p. 725–733, 1989.

LÓPEZ-LOZANO, J.L. et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 40, p. 997-1006, 2002.

LOWRY, O.H. et al... Prorein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MADEIRO, A.A.S.; LIMA, C.R. de. Estudos etnofarmacológicos de plantas medicinais utilizadas no Brasil: revisão de literatura. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.3. n. 1, p. 69-76, 2015.

MAMEDE, C.C.N. et al. Histological and Ultrastructural Analyses of Muscle Damage Induced by a Myotoxin Isolated from *Bothrops alternatus* Snake Venom. **Protein & Peptide Letters**, v. 20, p. 192-199, 2013.

- MAMEDE, C.C.N. et al.. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, v. 117, p. 37-45, 2016.
- MARKLAND Jr., F.S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3–18, 2013.
- MARKWELL, M.A. et al.. A modification of the Lowry procedures to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Analytical Biochemistry**, v. 87, p. 206-210, 1978.
- MARQUES, O.A.V. et al.. Serpentes do Cerrado. Ribeirão Preto, SP: Holos, 251 p. 2015.
- MARQUEZ, B. et al.. Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. **Phytochemistry** v. 66, p. 1804–1811, 2005.
- MARTINI, L.H. et al.. Compounds extracted from *Phyllanthus* and *Jatropha elliptica* inhibit the binding of [³ H] Glutamate and [³ H] GMP-PNP in rat cerebral cortex membrane. **Neurochemical Research**, v. 25, p. 211-215, 2000.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: UFV, 2000, p.220.
- MASSEY, D.J., et al.. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2576–2587, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.02.035>
- MELGAREJO AR. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Fan HW, Málaque CMS, Haddad Jr, editors. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 33–61.
- MeSH. Medical Subject Headings. Bethesda: US National Library of Medicine. 2020.
- MILAD, R. et al.. Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Review of Its Ethnomedicinal, Botanical, Chemical and Pharmacological Properties. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 1, p. 86-104, 2014. DOI: <https://doi.org/10.9734/EJMP/2014/5901>
- MODAHL, C.M, et al.. Venom analysis of long-term captive Pakistan cobra (*Naja naja*) populations. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 612–618, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.10.018>
- MORA, R. et al.. A Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, vol. 45, p. 651-660, 2005.
- MOREIRA, V. et al.. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, p. 12–20, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.004>

MOURA, V.M. et al.. Acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil e o uso de espécies vegetais como tratamento alternativo e complementar à soroterapia. **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 1, p. 73-84, 2015.

NADUR-ANDRADE, N. et al.. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. **Lasers Med Sci** v. 27, p. 65–70, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0914-1>

NISHIJIMA, C.M. et al.. The Anti-Inflammatory Effects of the Methanolic Extract and Fractions from *Davilla elliptica* St. Hil. (Dilleniaceae) on *Bothrops jararaca* Envenomation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p. 12454-12466, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms160612454>

OKAMOTO, D.N. et al.. P-I class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom is a post-proline cleaving peptidase with kininogenase activity: Insights into substrate selectivity and kinetic behavior. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1844, p. 545–552, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.12.014>

OLIVEIRA, F. et al.. Biochemical and functional characterization of BmooSP, a new serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 111, p. 130–138, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.01.055>

OLIVEIRA, I.C.F. et al.. [Prospective study of a *Bothrops jararacussu* venom batch \(Bj2015\) - phospholipase A2 activity, immunogenicity, neurotoxicity, and myotoxicity parameters.](#) **Journal Nature Products Research**, v. 33, n. 16, p. 2417-2421, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1446010>

OSHIMA-FRANCO, Y.; DAL BELO, C.A.. Recognizing Antiophidian Plants Using the Neuromuscular Junction Apparatus. **International Journal of Complementary & Alternative Medicine**, v. 5, n. 5, p. 00165, 2017.

PESSOA, C. et al.. Avaliação da atividade antitumoral e citotoxicidade da Jatrofona, um diterpeno extraído da *Jatropha elliptica* Muell Arg. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, n. 3/4, p. 59–60, 1999.

PESSOA, C. et al.. Investigação das atividades citotóxica e antitumoral da Jatrofona. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, n. 1, p. 114, 2007.

PIMENTEL, T.; MINGUZZI, S.. Estudo químico e testes biológicos das raízes de *Jatropha gossypifolia* e *Jatropha elliptica*. **Anais do ENIC**, 2012 - anaisonline.uems.br

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D.. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 24-9, 2001.

PUEBLA, P. et al.. Chemical Constituents of the Bark of *Dipteryx alata* Vogel, an Active Species against *Bothrops jararacussu* Venom. **Journal Molecules**, v. 15, n. 11, p. 8193-8204, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules15118193>

QUEIROZ, G.P. et al.. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, n. 52, p. 842-851. 2008.

QUEIRÓS, D.C. et al.. Perfil epidemiológico dos acidentados e fatores ambientais que favorecem acidentes ofídicos botrópicos, no Estado do Tocantins, Brasil. **Revista Desafios**, 2020. “ No prelo ”.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Alteração de tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpente *Bothrops jararaca* adulta e filhote. **Revista Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 44, n. 4, p. 143-145, 1989.

RIBEIRO, L.A. et al.. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 4, p: 312-318, 1998.

RICHARDS, D.P. et al.. Venom lethality and diet: Differential responses of natural prey and model organisms to the venom of the saw-scaled vipers (*Echis*). **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 110-116, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.015>

RODRIGUES, L. et al.. Ação da Heparina Contra a Atividade Neurotóxica da Miotoxina *Bothropstoxina-I*. **Saúde em Revista**, v. 6 n. 14, p. 19-29, 2004.

SABANDAR, C.W. et al.. Sahidin, “Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review,” **Phytochemistry**, vol. 85, p. 7–29, 2013.

SALDARRIAGA, M.M et al.. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v. 42, p. 405-411, 2003.

SALVADOR, G.H.M. et al.. Structural and functional studies with mytoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A2-like. **Toxicon** v. 72, p. 52–63, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.013>

SANTOS, M.G. et al.. Levantamentos etnobotânicos realizados em duas comunidades de remanescentes de negros da região do Jalapão, Estado do Tocantins. In: Pires, A. L. C. S. & Oliveira, R. (Org.s) **Sociabilidades Negras. Comunidades Remanescentes, Escravidão e Cultura**. Belo Horizonte: Editora gráfica Daliana Ltda, 2006. p. 29-49.

SANZ, L., et al.. Venom Proteomes of Closely Related *Sistrurus* Rattlesnakes with Divergent Diets. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 9, p. 2098–2112, 2006.

SANTOS, A. F. dos et al.. A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology Research, New York**, v. 113, p. 1077– 1084, 2014.

SEGURA, Á. et al.. Preclinical efficacy against toxic activities of medically relevant *Bothrops* sp. (Serpentes: Viperidae) snake venoms by a polyspecific antivenom produced in Mexico. **Revista de Biologia Tropical**, v. 65, n. 1, p. 345-350, 2017.

SERRANO, S.M.T. et al. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, p. 501–510, 2005.

SERRANO, S.M.T. et al.. Basic proteinases from *Bothrops mooojeni* (Caissaca) venom-I. Isolation and Activity of two Serine proteinases, MSP1 and MSP2, on syntetic substrates and platelet aggregation. **Toxicon**, n. 31, n. 4, p. 471-481, 1993.

NISHIDA, S. et al.. Purification and Characterization of Bothrombin, a Fibrinogen-clotting Serine Protease from Venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry** 33: 1843-1849, 1994.

SILVA, J.O. et al.. Triterpenoids saponins, new metalloproteinase snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, p. 283, 2010.

SILVA, L.M.M. et al.. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Lutzelburgia auriculata* Duck (pau-serrote) e *Pterogyne nitens* Tul (madeira nova do brejo) - Leguminosae. **Revista Brasileira de Sementes** n. 17, p.154-159, 1995.

SILVA, R. C.C.; et al.. **Serpentes no estado do Tocantins: guia ilustrado**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2017.

SILVA, S.M.P. et al.. Aspectos fenológicos da purga-de-lagarto (*Jatropha elliptica* M.Arg. - Euphorbiaceae) em Santo Antônio do Leverger –MT. **Revista Brasileira de Biologia**, v.58, n.2, p.301-6,1998.

SILVA, S.M.P.; COELHO, M.F.B.; COSTA, A.C.S. Germinação de purga-de-lagarto (*Jatropha elliptica* M. Arg. – Euphorbiaceae) em condições naturais. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, 1996. p.49.

SILVEIRA, L.B. et al.. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from *Bothrops mooojeni* snake venom. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 35–43, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.04.008>

SOARES, A.M. et al.. Medicinal Plants With Inhibitory Properties Against Snake Venoms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2625-2641, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2174/092986705774370655>

SOUSA, B.B. de, et al.. A New Platelet-Aggregation-Inhibiting Factor Isolated from *Bothrops mooojeni* Snake Venom. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/4315832>

SOUZA, C. D. & FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 135-142. 2006.

SOUZA, L.F. 1998. Estudo etnobotânico na comunidade de Baús: o uso de plantas medicinais (Município de Acorizal, Mato Grosso). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.

SOUZA, L.L. et al.. Determination of Toxic Activities in *Bothrops* spp. Snake Venoms Using Animal-Free Approaches: Correlation Between In Vitro Versus In Vivo Assays. **Toxicological Sciences**, v. 147, n. 2, p. 458–465, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv140>

SUNAGAR, K. et al.. Ecological venomics: How genomics, transcriptomics and proteomics can shed new light on the ecology and evolution of venom. **Journal of Proteomics**, v. 135, p. 62-72, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.015>

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A.. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin World Health Organization**, v. 61, p. 949-956, 1983.

TREBIEN, H.A.. Evaluation of Pharmacological activity of a crude hydroalcoholic extract from *Jatropha elliptica*. **Phytoterapy Research**, vol. 2, p. 115-118, 1998.

TRIBUIANI, N. et al.. *Vellozia flavicans* Mart. Ex Schult. Hydroalcoholic extract inhibits the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom. **Jornal BMC Complementary Alternative Medicine and Terapy**, v. 14, n. 48, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-48>

UTKIN, Y.N. Animal venom studies: Current benefits and future developments. **World Journal Biology Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 28-33, 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28>

VALENTE, R. H., et al.. *Bothrops insularis* venomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 241–255, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.001>.

VAN DER BERG, M.E.; SILVA, M.H.L.. Contribuição à flora medicinal de Mato Grosso do Sul. **Revista Acta Amazônica**, v. 18, p. 9-22, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-43921988185022>

VIEIRA, R.E. et al.. 2002. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas**: Resultados da 1ª Reunião Técnica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Ibama, CNPq, Brasília.

VILAR, J.C. et al.. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas. **Biologia Geral e Experimental**, v. 6, n. 1, p. 3-36, 2005.

WARRELL, D.A. Snake bite. **Lancet**, n. 375, p. 77-88. 2010.

WHO. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. **World Health Organization**, 2018.

WONG, E.S.W. et al.. Identification of natural killer cell receptor clusters in the platypus genome reveals an expansion of C-type lectin genes. **Immunogenetics**, v. 61, p. 565–579, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00251-009-0386-7>

WRAY, K.P. et al.. Early significant ontogenetic changes in snake venoms. **Toxicon**, v. 96, p. 74-81, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.01.010>

YAZBEK, P.B. et al.. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women´s health conditions among Brazilian cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 310-331, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.054>

YIN, W. et al.. Evolutionary trajectories of snake genes and genomes revealed by comparative analyses of five-pacer viper. **Nature Communication**, n. 7, p. 13107, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms13107>

ZAQUEO, K. D.; ZAQUEO, K. D.. Ofidismo em Mato Grosso entre os anos 2010 e 2015. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, v. 6, n. 3, p. 29-40, 2018. <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2018v6n3p29-40>

ZELANIS, A. et al.. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **Journal of proteome**, n. 9, p. 2278-2291. 2010.

ZELANIS, A. et al.. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. **Journal of Proteomics**, v. 11, n. 21, p. 4218-4228, 2011.

ZELANIS, A., et al. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. **Journal of Proteomics**, n.113, p. 260–267, 2015.

ZINGALI, R. B. et al.. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, n. 40,1993.

ANEXOS

ANEXO 1 – Licença do SISBIO para coleta de serpentes



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52416-2	Data da Emissão: 09/02/2017 10:53	Data para Revalidação*: 11/03/2018
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Carla Simone Seibert	CPF: 663.327.101-87
Título do Projeto: A DIVERSIDADE E TOXICIDADE DAS SERPENTES DO ESTADO DO TOCANTINS	
Nome da Instituição: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS	CNPJ: 05.149.726/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta de serpentes	04/2016	11/2016
2	extração de veneno	04/2016	12/2019
3	caracterização química dos venenos	04/2016	06/2017
4	atividades enzimáticas dos venenos	04/2016	12/2018
5	Análise da fisiopatologia dos envenenamentos e neutralização pelos antivenenos	04/2016	12/2019
6	análise dos dados, produção de textos de divulgação científica	04/2016	04/2020

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	PAULO SERGIO BERNARDE	coleta e manuseio dos animais	095.451.098-40	213259710 SSP-SP	Brasileira
2	Leijiane Figueira de Sousa	ensaios laboratoriais	600.641.882-72	3308476 SEGUP-PA	Brasileira
3	Luis Roberto de Camargo Gonçalves	ensaios laboratoriais	012.897.376-19	10912473X SSP-SP	Brasileira
4	RAIANY CRISTIANE CRUZ DA SILVA	coleta e manuseio dos animais, ensaios laboratoriais	024.983.781-11	625581 SSP-TO	Brasileira
5	Denise Vilarinho Tambourgi	ensaios laboratoriais	050.043.288-03	7.667.694-8 SSP-SP	Brasileira
6	Ida Sigueko Sano martins	ensaios laboratoriais	689.043.128-68	4540002-7 ssp-SP	Brasileira
7	katia cristina barbaro	ensaios laboratoriais	100.329.498-71	13658309 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17613752



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52416-2	Data da Emissão: 09/02/2017 10:53	Data para Revalidação*: 11/03/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Carla Simone Seibert	CPF: 663.327.101-87
Título do Projeto: A DIVERSIDADE E TOXICIDADE DAS SERPENTES DO ESTADO DO TOCANTINS	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS	CNPJ: 05.149.726/0001-04

8	CARINE CAVALCANTE CHAMON	coleta e manuseio de serpentes	092.732817-88	10223815-1 DETRAN-RJ	Brasileira
9	DIANA REGO AMAZONAS	ensaios laboratoriais	746.050.032-15	4227604 SEGUP-PA	Brasileira
10	Sâmella Silva de Oliveira	ensaios laboratoriais	867.209.882-04	4639361 SEGUP-PA	Brasileira
11	Eliana Faquim de Lima Mauro	ensaios laboratoriais	134.270.528-93	21583159-7 SSP-SP	Brasileira
12	ANA MARIA MOURA DA SILVA	ensaios laboratoriais	011.789.788-42	7923142-1 SSP-SP	Brasileira
13	Sara Costa Ferreira Rodrigues	Coleta e manuseio de serpentes, ensaios laboratoriais	476.631973-72	1224700 SSP-TO	Brasileira
14	Cassio Mílhomens Rodrigues	coleta e manuseio de serpentes, ensaios laboratoriais	906.718.561-20	411885 SSP-TO	Brasileira
15	SAVIO STEFANINI SANT'ANNA	coleta e manuseio das serpentes	130.023.398-22	9813932-0 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PALMAS	TO	Distrito de Taquaruçu	Fora de UC Federal
2	ARAGUAÍNA	TO	Área rural de Araguaína	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Squamata
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Squamata
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Squamata (*Qtde: 12)
4	Marcação de animais silvestres in situ	Squamata

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Outras amostras biológicas (veneno dos esp. Anolis)
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Armadilha de queda "pit fall", Captura manual, Puçá, Laço com cabo de aço
3	Método de marcação (Répteis)	Microchip

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	INSTITUTO BUTANTAN	criadouro científico

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17613752



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52416-2	Data da Emissão: 09/02/2017 10:53	Data para Revalidação*: 11/03/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Carla Simone Seibert	CPF: 663.327.101-87
Título do Projeto: A DIVERSIDADE E TOXICIDADE DAS SERPENTES DO ESTADO DO TOCANTINS	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS	CNPJ: 05.149.726/0001-04

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17613752



Página 3/3

ANEXO 2 – Declaração do SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A9CEBC9

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A9CEBC9**
Usuário: **Carla Simone Seibert**
CPF/CNPJ: **663.327.101-87**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Jatropha elliptica

Título da Atividade: **ESTUDO DA PROPRIEDADE ANTIOFÍDICA DA *Jatropha elliptica* (Pohl.) Mull Arg.**

Equipe

Carla Simone Seibert UFT
Sára Cósta Ferreira Rodrigues UFT

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Revista Ibero Americana de Ciências Ambienta**

Data do Cadastro: **13/12/2020 23:03:24**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **23:03** de **13/12/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO 3 - Análise cromatográfica do veneno de *Bothrops moojeni* (Filhotes fêmeas e machos)

Detector A Ch1 214nm

Pico	Tempo de ret. FIL ♀	Área % FIL ♀	Altura % FIL ♀	Tempo de ret. FIL ♂	Área % FIL ♂	Altura% FIL ♂
1	32.549	1.579	2.905	32.551	1.718	3.154
2	33.119	2.927	5.206	33.124	2.921	5.064
3	37.676	1.367	1.455	37.656	1.750	1.888
4	57.001	1.747	2.996	56.988	1.572	2.727
5	57.475	0.460	0.986	57.452	0.261	0.609
6	58.342	0.905	0.703	58.191	0.889	0.693
7	61.647	13.223	14.677	61.578	15.118	15.635
8	64.272	3.969	4.570	64.203	3.562	3.768
9	65.870	2.941	4.236	65.804	2.748	3.955
10	66.711	5.821	8.388	66.713	4.599	6.731
11	69.461	2.962	3.039	69.375	3.312	3.613
12	70.654	0.337	0.287	70.633	0.511	0.471
13	71.841	0.141	0.242	75.887	24.700	13.535
14	75.905	19.769	8.522	80.731	1.676	1.625
15	80.571	4.436	3.099	81.864	10.186	5.295
16	81.959	9.839	5.417	83.714	0.968	0.903
17	83.758	1.250	1.226	84.607	1.384	2.100
18	84.628	2.516	3.139	85.452	11.952	14.649
19	85.471	11.783	14.352	86.174	0.259	0.733
20	86.814	5.847	5.983	86.812	4.541	5.307
21	87.479	4.438	6.360	87.440	3.533	5.168
22	88.232	1.742	2.211	88.196	1.586	2.090
23	-	-	-	89.483	0.256	0.286
Total		100.000	100.000		100.000	100.000

ANEXO 4 - Análise cromatográfica do veneno de *Bothrops moojeni* (mãe)

Deector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	32.758	11030346	645537	2.054	3.605
2	33.295	21465097	1282174	3.996	7.160
3	57.694	95290499	3017139	17.741	16.848
4	62.639	35721637	1590602	6.651	8.882
5	64.725	9077278	324736	1.690	1.813
6	66.384	1191260	65075	0.222	0.363
7	67.010	3858349	176419	0.718	0.985
8	68.651	10519574	417624	1.959	2.332
9	69.548	20331511	949879	3.785	5.304
10	71.439	6211152	197417	1.156	1.102
11	76.756	121801086	2755758	22.677	15.388
12	81.206	4949070	145909	0.921	0.815
13	85.118	70783175	2805082	13.178	15.664
14	85.856	929403	73895	0.173	0.413
15	86.676	118954833	3245897	22.147	18.125
16	88.214	3460785	154560	0.644	0.863
17	89.108	1540435	60253	0.287	0.336
Total		537115491	17907955	100.000	100.000