

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA COMITÊ  
CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOFÍDICO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE  
*Bellucia dichotoma* Cogn., ORIUNDOS DO PARÁ E AMAZONAS, FRENTE ÀS  
ATIVIDADES FOSFOLIPÁSICA A<sub>2</sub>, COAGULANTE E “ENZIMÁTICA” DA PEÇONHA  
DE *Bothrops atrox*

Bolsista: Luana Yamille Andrade de Souza, CNPq

MANAUS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA COMITÊ  
CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO PARCIAL

PIB-B

VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOFÍDICO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE  
*Bellucia dichotoma* Cogn., ORIUNDOS DO PARÁ E AMAZONAS, FRENTE ÀS  
ATIVIDADES FOSFOLIPÁSICA A<sub>2</sub>, COAGULANTE E “ENZIMÁTICA” DA PEÇONHA  
DE *Bothrops atrox*

Bolsista: Luana Yamille Andrade de Souza, CNPq

Orientador: Prof. Doutora Maria Cristina dos Santos

Coorientadora: MSc Valéria Mourão de Moura

MANAUS

2015

## **Sumário**

1. RESUMO.....	04
2. INTRODUÇÃO.....	04
3. OBJETIVOS.....	06
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	07
5. RESULTADOS.....	11
6. DISCUSSÃO .....	15
7. REFERÊNCIAS.....	18
8. CRONOGRAMA.....	20

## 1. Resumo

*Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) é uma espécie vegetal que possui distribuição geográfica em quatro Estados da Região Norte do Brasil. Suas cascas são bastante utilizadas por moradores de comunidades em Santarém-PA, para o tratamento contra Acidente Ofídico. O extrato aquoso de *B. dichotoma* coletado em Santarém-PA, apresenta grande potencial contra atividades biológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox* - a serpente responsável pela maioria dos acidentes ofídicos da Região Norte. Portanto, o objetivo desse estudo foi verificar se os exemplares coletados em outro estado Amazônico mantêm os efeitos bloqueadores da espécie coletada em Santarém. Para isso, extratos aquosos foram elaborados de cascas de *B. dichotoma* coletadas em duas áreas geográficas distintas: Manaus-AM e Santarém-PA. O preparo dos extratos foi realizado de acordo com a prática dos moradores das comunidades de Santarém-PA, que utilizam a planta em forma de chá por decocção. O veneno utilizado foi extraído de indivíduos adultos de *Bothrops atrox*, provenientes da Floresta Nacional do Tapajós, Santarém-PA. A atividade fosfolipásica  $A_2$ , foi mensurada pela ação hemolítica indireta em gel de agarose, usando gema de ovo como substrato e eritrócitos, utilizando protocolos de pré-incubação (veneno:extrato) e sem pré-incubação (extratos incorporados no momento do preparo do gel). Posteriormente foram realizados ensaios para verificar o efeito bloqueador dos extratos de *B. dichotoma* na atividade coagulante do veneno; e o efeito da interação dos extratos aquosos com proteínas do veneno de *B. atrox*, por técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. A inibição da ação proteolítica do veneno foi verificada pela técnica de zimografia. Os resultados preliminares mostram que os extratos aquosos oriundos de Santarém e Manaus, foram capazes de bloquear 100% a atividade fosfolipásica do veneno de *B. atrox* pelo protocolo de pré-incubação e quando aplicados diretamente ao gel (sem pré-incubação) não houve redução significativa.

## 2. Introdução

O Acidente Ofídico representa um sério problema público de saúde, sendo inclusive considerado, pela Organização Mundial da Saúde, desde 2009, uma

Doença Tropical Negligenciada (WHO 2007, 2009). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, no ano de 2013, ocorreram aproximadamente 25 mil acidentes com serpentes peçonhentas sendo 34% desses acidentes registrados na região Norte do país (BRASIL, 2014). Nesta região, o problema é agravado devido às longas distâncias, entre os locais de ocorrência do acidente e o atendimento médico, a dificuldade de transporte e a muitas vezes a falta de antiveneno nas unidades de saúde dos municípios (BORGES et al., 1999; DOS-SANTOS, 2009).

Conhecida como jararaca-do-norte, jararaca-do-rabo-branco, surucucurana, *Bothrops atrox* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem na região Norte, e seu veneno desencadeia uma série de ações locais e sistêmicas em suas vítimas (SILVA et al., 2011). Os sinais e sintomas presentes no local da picada são: dor, edema, hemorragia e necrose, e os sistêmicos, coagulopatias, hemorragia e falência renal. O quadro clínico desenvolvido pela vítima pode ser muito variado, dependendo da quantidade de veneno inoculado, localização da picada, idade da vítima e principalmente do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico. A necrose muscular é uma séria consequência dos acidentes com jararacas que pode levar a uma perda permanente do tecido e da funcionalidade, requerendo, muitas vezes, a amputação do membro atingido.

A maioria dos acidentes ofídicos é causado por membros das famílias Viperidae e Elapidae, e dentre os viperídeos, o gênero *Bothrops* sp. representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas, com ampla distribuição no território brasileiro (BRASIL, 2005). As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* sp. são misturas complexas de proteínas com ou sem atividade enzimática, como fosfolipases A<sub>2</sub>, metaloproteinases, serinoproteases, entre outras. As fosfolipases A<sub>2</sub> constituem a maioria dos componentes tóxicos da peçonha das jararacas e desencadeia uma variedade de ações farmacológicas pelos mecanismos que podem ser dependentes ou independentes de sua atividade enzimática, como neurotoxicidade, miotoxicidade, hemólise, efeitos sobre plaquetas, indução de edemas e danos em tecidos.

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para acidentes ofídicos consiste na administração, mais precocemente possível, do antiveneno específico para cada tipo de acidente, por via intravenosa, e sua posologia depende da gravidade do acidente. O tratamento com o antibotrópico, por exemplo, baseia-se na

neutralização das ações tóxicas, dos diversos componentes presentes na peçonha, pelas imunoglobulinas purificadas, obtidas do plasma de equinos hiperimunizados com mistura de peçonhas de algumas espécies de serpentes do gênero *Bothrops*. Na região Norte, frequentemente, as plantas medicinais são utilizadas ou como coadjuvantes à soroterapia, ou como medicamento alternativo, administrado na falta de soroterápicos específicos (CARDOSO et al., 2003; MORS et al., 2000; OTERO, 2000).

*Bellucia dichotoma* Cogn. pertence à família Melastomataceae, e é uma espécie nativa da região Amazônica, possui porte médio, podendo atingir até 10 m de altura, com distribuição geográfica em quatro Estados da Região Norte: Acre, Amazonas, Amapá e Pará. É conhecida popularmente por “goiaba-de-anta”, foi coletada em Santarém no Pará, e recentemente estudada pelo nosso grupo e seu extrato aquoso, elaborado com as cascas, apresentou uma potente atividade antiedematogênica, frente ao veneno de *Bothrops atrox*. Portanto, o objetivo do presente estudo foi comparar o potencial antiofídico de extratos aquosos de *B. dichotoma*, coletadas em duas diferentes áreas geográficas: Manaus (Amazonas) e Santarém (Pará) frente às seguintes atividades in vitro: fosfolipásica A2, coagulante e enzimática do veneno de *Bothrops atrox*.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral:**

Comparar os efeitos bloqueadores dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma*, elaborados das cascas coletadas de espécimes oriundas de Manaus-AM ou de Santarém-PA, frente às atividades biológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

- Preparar extratos aquosos provenientes das cascas de *Bellucia dichotoma* de acordo com o método tradicional;
- Comparar os efeitos bloqueadores dos extratos aquosos de *B. dichotoma* coletada em duas áreas de savana: Manaus-AM e Santarém-PA, frente às atividades fosfolipásica, coagulante e proteolítica (zimografia) induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*;

- Avaliar a ação direta dos extratos de *B. dichotoma* sobre o veneno de *B. atrox* por eletroforese (SDS-PAGE) e Western blot.

#### **4. Material e métodos**

##### **4.1 Coleta e identificação do Material Vegetal**

As amostras de cascas da espécie vegetal *Bellucia dichotoma* foram coletadas em área de savana, nas proximidades da comunidade de Cucurunã (02°27'21.0"S e 54°47'45.7"W) Santarém, Pará, e no Bairro do Tarumã, Manaus, Amazonas, Brasil (2°58'46.62"S e 60°5'20.86"W). Exsicatas foram feitas em todas as coletas para confirmação da identificação botânica da espécie. A identificação botânica da espécie proveniente de Santarém- PA, foi realizada no Herbário EMBRAPA/Amazônia Oriental (Belém – PA, Brasil), e a exsicata encontra-se depositada sob o código (IAN) 185213. A identificação botânica da espécie proveniente de Manaus-AM, foi realizada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas – INPA e a exsicata encontra-se depositada sob o código INPA N<sup>o</sup> 268216. Uma cópia da exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, sob o número de registro 10071.

##### **4.2. Obtenção dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma***

Os extratos aquosos foram preparados com base em informações populares, de acordo com a prática dos moradores das comunidades do Eixo Forte da Região Oeste do Pará, Amazônia, Brasil. Para isto, foram utilizados 50 g de cada pó das cascas de *Bellucia dichotoma*, coletadas nas duas áreas de estudo (Manaus-AM e Santarém-PA), extraídas com água destilada na proporção de 1:10 (m:v) sob agitação constante de 1.250 rpm e temperatura de 100 °C até a fervura. Após esfriar, foram retirados de cada preparação 150 mL, que é a quantidade equivalente a um copo de chá, como utilizado popularmente. Em seguida, os 150 mL de cada extrato foram liofilizados e o peso final foi de 2,9 g.

##### **4.3. Obtenção do veneno de *Bothrops atrox* e do soro antiofídico (SAB)**

O veneno utilizado foi doado pelo laboratório de Pesquisas Zoológicas das Faculdades Integradas do Tapajós, extraído de serpentes adultas de *Bothrops atrox*, provenientes da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada no Km 83 da BR-163, Santarém, PA, Brasil. A coleta de serpentes e a extração do veneno foram

aprovadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - nº 14018). O veneno foi coletado *in natura* e liofilizado no laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, da Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA, Brasil e será mantido a -20 °C, até o momento do uso. O soro antibotrópico (SAB) utilizado foi o do Lote nº: 105113B, produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

#### **4.4. Atividade fosfolipásica**

A avaliação da atividade da Fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) foi mensurada pela ação hemolítica indireta em gel de agarose, usando gema de ovo como substrato e eritrócitos, como marcadores da atividade enzimática. A dose mínima hemolítica indireta (DMHi) foi definida por Gutiérrez, et al. (1988) como sendo a quantidade de veneno capaz de produzir um halo hemolítico de 10 mm. Para esta atividade utilizamos duas vezes a DMHi de 1,25 µg, padronizada em trabalho anterior para esse pool de veneno (Moura et al., 2014). O efeito bloqueador da atividade fosfolipásica pelos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* (EABd) foram avaliados de acordo com os seguintes protocolos: 1) pré-incubação por 30 minutos a 37° C dos extratos misturados com duas DMHi de VBa (Veneno *Bothrops atrox*) nas proporções de 1:10, 1:20 (m:m) e os controles com VBa + Salina e VBa + SAB; 2) extrato aquoso ou SAB foram incorporados na etapa final do preparo do gel, utilizando concentrações baseadas na utilização popular (48,3, 145 e 283,3 mg/kg) (MOURA et al., 2014). A inibição da atividade enzimática foi expressa como percentual, onde 100% de inibição corresponderam à ausência do halo hemolítico. Cada ensaio foi realizado em triplicata e expresso como média ± desvio padrão da média.

#### **4.5. Atividade coagulante**

A atividade coagulante foi calculada de acordo com Assakura e colaboradores (1992). Sendo expressa pelo tempo médio de coagulação em segundos de 200 µL de plasma previamente incubados a 37° C, induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*. O tempo necessário para a formação da rede de fibrina na forma de coágulo foi medido em segundos e observado visualmente. Foi determinada a dose mínima coagulante (DMC) que é a concentração de veneno capaz de coagular o plasma em



60 s. O efeito bloqueador dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* na atividade coagulante do veneno foi avaliado de duas formas: (1) os extratos foram incubados previamente com a DMC do veneno por 30 minutos a 37° C nas proporções de 1:10 e 1:20 veneno:extrato (m:m) e em seguida a mistura foi adicionada ao plasma e a coagulação monitorada como descrito acima. (2) concentrações de extratos e a DMC do veneno foram adicionados sem pré-incubação ao plasma e a coagulação monitorada visualmente; (3) extratos aquosos, veneno ou soro antibotrópico foram adicionados concomitantemente ao plasma, com concentrações baseadas na utilização popular (48,3, 145 e 289,8 mg/kg, soro antibotrópico 100 µL). A ausência da rede de fibrina depois de decorrido um tempo máximo de 10 minutos foi considerado como 100% de inibição ou, no caso dos extratos, ausência de atividade.

#### **4.6. Atividade proteolítica/zimografia**

A presença de enzimas proteolíticas no veneno de *Bothrops atrox*, nos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* e o bloqueio das enzimas do veneno pelos extratos foram verificados por zimografia de acordo com Monteiro-Dos-Santos, et al., (2011). Para este ensaio, o SDS-PAGE foi preparado nas mesmas condições descritas anteriormente, porém, com 2mg/mL de gelatina (Sigma) incorporada ao gel. Ao final da corrida, o gel foi lavado com tampão contendo Tris-HCl 50 mM, Cloreto de Cálcio 5 mM e Triton X-100 2,5%, durante 30 minutos. Após a lavagem, o gel foi imerso no tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, cloreto de cálcio 5 mM, Triton X-100 2,5% e ázida sódica 0,02%) a 37° C, durante 16 horas. Após esse procedimento, o gel foi corado com solução corante (Coomassie-Blue, Bio-Rad, R-250, CA, USA), durante 24 horas e levemente descorado por 30 minutos. A avaliação da atividade proteolítica ocorreu com o aparecimento de regiões mais claras no gel, contrastando com o fundo azul (resultado da digestão do substrato presente na matriz poliacrilamida-gelatina).

#### **4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e Western blot**

Para verificar o efeito da interação dos extratos aquosos com proteínas do veneno de *Bothrops atrox*, foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970), utilizando-se gel de corrida na concentração de 12,5% e o de empacotamento, 5%. Neste processo,

alíquotas de veneno de *B. atrox* e extratos foram incubadas por 30 minutos a 37° C na proporção de 1:10 veneno:extrato (m/m), centrifugadas a 1300 rpm por 5 minutos e analisado sob condições não redutoras. Um gel foi corado com Coomassie Brilhante Blue (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) e o outro foi utilizado no Western blot. Para isso, as proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), no sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-RD), sob corrente constante de 200 mA, durante 3 horas, sob refrigeração. Logo após a transferência, a membrana foi imersa, durante a noite, na solução bloqueadora (TBS contendo 5% de leite em pó desnatado Molico-Nestlé-SP), a 4° C. Após esta etapa, anticorpos primários (soro antitoxinogênico – SAB) foram adicionados seguindo a diluição de 1:1000 no tampão de TBS por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida a membrana foi lavada com salina 0,9%, por cinco vezes e adicionado o conjugado anti-IgG de cavalo marcado com a peroxidase, produzido em coelhos (Sigma-Aldrich, Israel), na diluição de 1:1000 em TBS, por 1 hora à temperatura ambiente. Para revelação foi adicionada solução cromógena (Diaminobenzidina-DAB), em presença do substrato da peroxidase, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 30%. A reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água destilada.

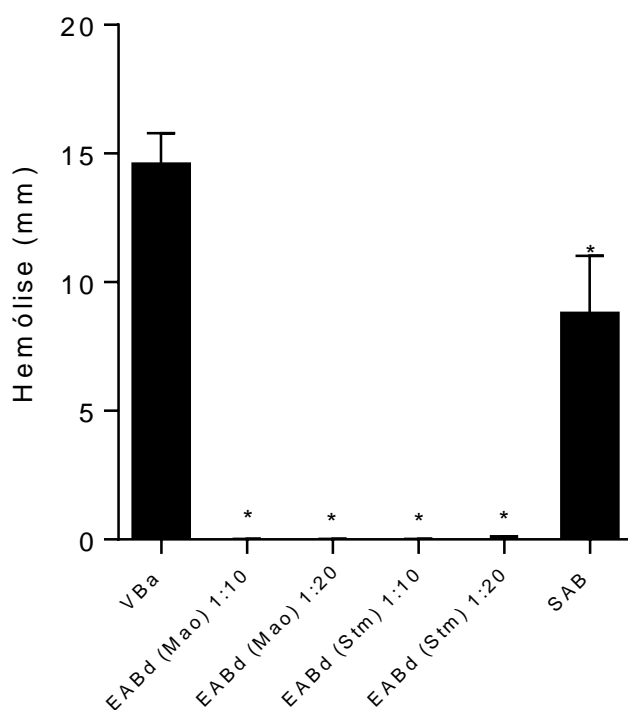
#### **4.8. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para comparação das médias será utilizado Análise de Variância (ANOVA) One-Way, seguida do pós-teste de Tukey (para múltiplas comparações). O nível de significância adotado será de  $\alpha = 0,05$ .

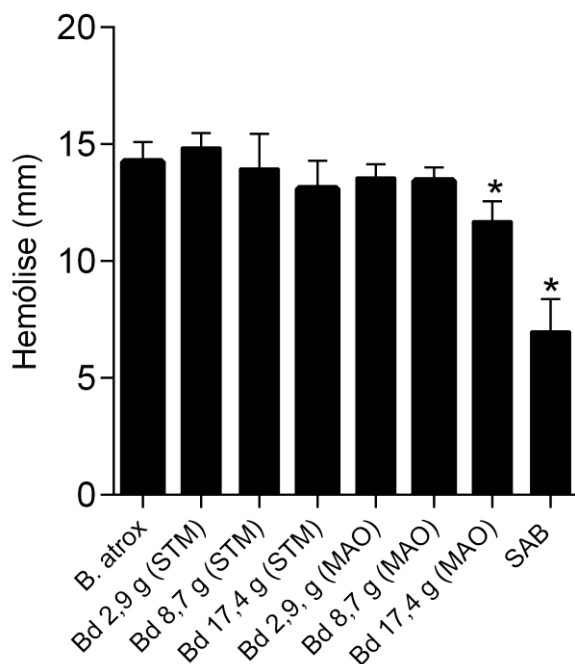
## 5. Resultados

### 5.1. Inibição da atividade fosfolipásica

Pelo protocolo de pré-incubação (veneno:extrato), nas proporções de 1:10 e 1:20 (Fig. 1), os extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* de Manaus (EABd-Mao) e Santarém (EABd-Stm), bloquearam 100% a atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, a DMHi foi de 1.25µg/ensaio baseado em MOURA et al., 2014. O bloqueio observado foi mais eficaz do que o tratamento padrão (SAB), que reduziu 50,9% a atividade fosfolipásica causada pelo veneno. Todavia, os extratos quando incorporados somente ao gel e o veneno aplicado posteriormente, sem pré-incubação, não houve inibição significativa nas diferentes doses testadas dos extratos, exceto para EABd-Mao que reduziu 17,9% na dose de 283,3 mg/kg ( $p = 0,02$ , quando comparado com o grupo controle positivo, veneno de *B. atrox*). Porém, não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos com os dois extratos em todas as concentrações avaliadas (Fig. 2).



**Fig. 1.** Potencial de bloqueio dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* frente à atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops atrox* pelo protocolo de pré-incubação, nas proporções de 1:10 e 1:20 (veneno:extratos, m:m). \*  $p < 0,05$  vs. Controle (VBa) e salina. Teste de Tukey,  $n = 4$  por grupo.



**Fig. 2.** Efeito bloqueador dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma*, sem pré-incubação, testados em diferentes doses de acordo com a prática popular. \*Inibição significativa do extrato aquoso de Manaus em relação ao controle positivo (veneno de *Bothrops atrox*)

## 5.2. Inibição da atividade coagulante

A dose mínima coagulante (DMC) do veneno de *Bothrops atrox* foi de 2,25 µg, e utilizado 2DMC nos ensaios de bloqueio. Os extratos aquosos provenientes de Manaus - AM e Santarém - PA e o soro antiofídico inibiram 100% a atividade coagulante do veneno de *B. atrox* quando utilizado o protocolo de pré-incubação (veneno:extratos, m:m) (Tabela 1). No protocolo utilizando as mesmas concentrações da pré-incubação (1:10 e 1:20 m:m), porém aplicando as amostras concomitantemente, sem a utilização da pré-incubação das amostras por 30 minutos à 37° C, o extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* oriundo de Manaus, teve bloqueio máximo de 25% (1:20, m:m), e o extrato aquoso oriundo de Santarém, de 16% (1:10, m:m). No entanto, não houve diferença significativa quando comparado o potencial de inibição entre os dois extratos de *B. dichotoma* avaliados. Quando utilizado as doses conforme uso tradicional, o bloqueio da atividade coagulante do veneno de *B. atrox* foi de 100%, tanto para os extratos aquosos de Manaus e Santarém, como para o soro antiofídico.

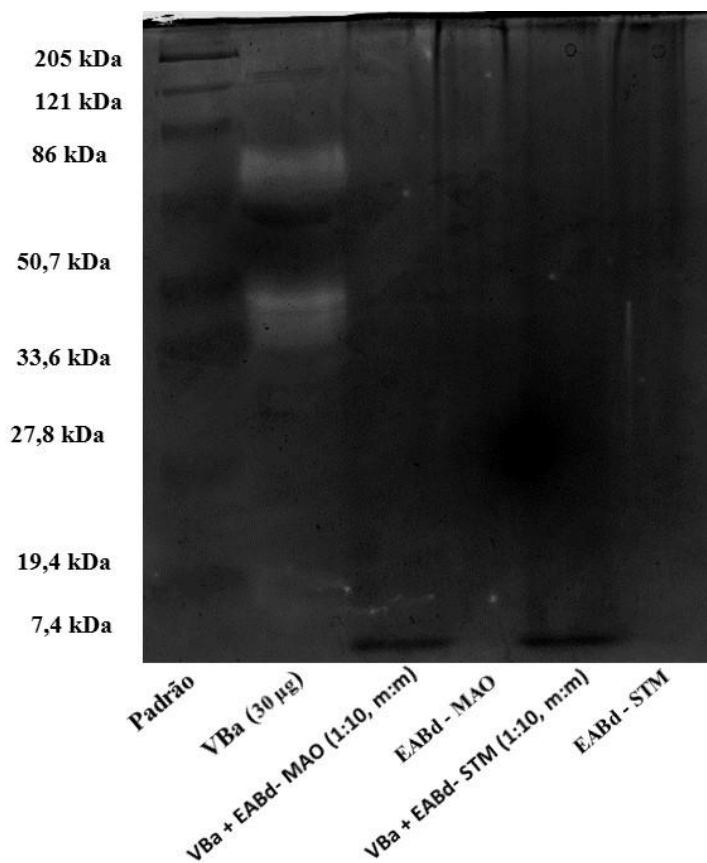
**Tabela 1.** Potencial de bloqueio dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* frente a atividade coagulante induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*. Onde: EABd – MAO (extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*- proveniente de Manaus - Amazonas), e EABd - STM (extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*- proveniente de Santarém - Pará).

Amostras	Venom (4,5 µg)	Atividade coagulante (min)	
		1:10 (m:m)	1:20 (m:m)
<b>Com pré-incubação</b>			
<i>Bothrops atrox</i>	24,3 s	-	-
VBa + EABd – MAO	-	> 10 min*	> 10 min*
VBa + EABd - STM	-	> 10 min*	> 10 min*
Soro antibotrópico	-		> 10 min*
<b>Sem pré-incubação</b>			
<i>Bothrops atrox</i>	21 s		
VBa + EABd – MAO	-	1 min 47 s*	2 min 30 s*
VBa + EABd - STM	-	1 min 36 s*	1 min 34 s*
Soro antibotrópico	-	6 min 51 s*	7 min 53 s*

\*  $p < 0,05$  vs. Controle VBa (veneno de *Bothrops atrox*) e salina, teste de Tukey,  $n = 4$ /por grupo.

### 5.3. Inibição da atividade proteolítica/zimografia

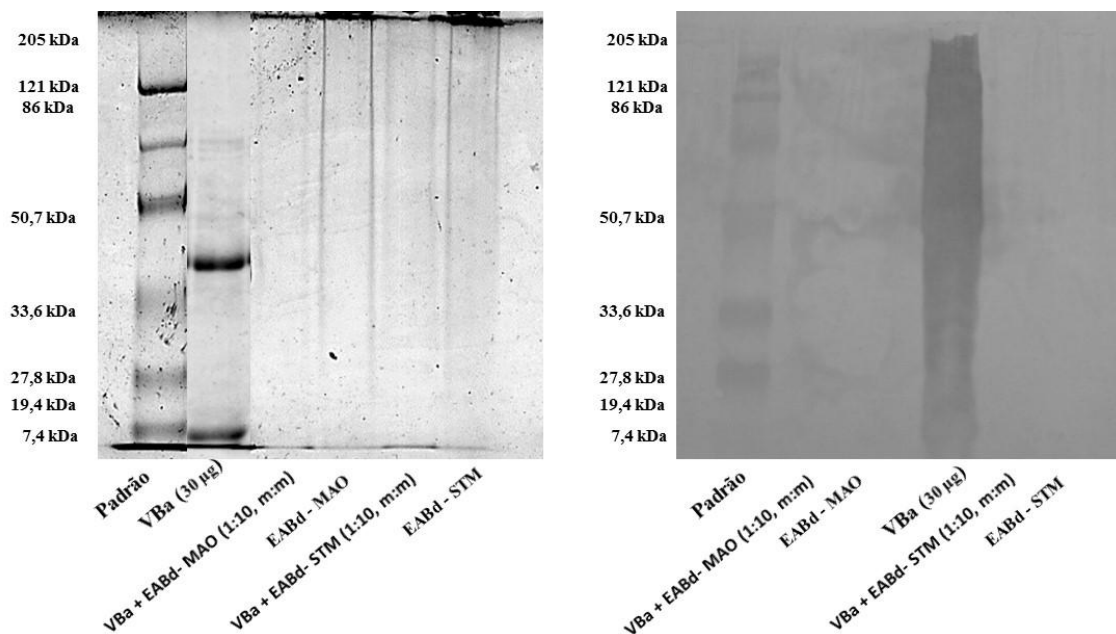
Na zimografia, o veneno de *Bothrops atrox* (30 µg) apresentou duas bandas marcantes, a primeira de aproximadamente 86 kDa, e a segunda entre 50, 7 e 33, 6 kDa. Nos perfis das misturas do veneno com os extratos vegetais (1:10, m:m) não foram detectadas nenhuma banda com atividade sobre a gelatina.



**Figura 3.** Zimografia da atividade gelatinolítica do veneno de *Bothrops atrox* e do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* provenientes de Santarém - PA e Manaus - AM. As bandas sem coloração no gel indicam a presença de enzimas no veneno de *B. atrox* ou no extrato aquoso de *B. dichotoma* com atividade sobre a gelatina presente no gel.

#### 5.4. Eletroforese em SDS/PAGE e Western blot

Os perfis das proteínas presentes no veneno de *Bothrops atrox* e na mistura de veneno mais os extratos aquosos de Manaus e Santarém estão representados na figura 4. Quando comparado o perfil do veneno de *B. atrox* com as amostras pré-incubadas de veneno + extrato Manaus ou Santarém, não foram observadas todas as bandas proteicas. Proteínas de altas massas moleculares (acima de 205 kDa) e entre 50,7 e 86 kDa, presentes na amostra de veneno de *B. atrox*, não foram reveladas pelo Coomassie e foram fracamente reveladas pelos anticorpos presentes no SAB.



**Figura 04:** Interação entre os extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* e o veneno de *Bothrops atrox*. Onde, 1) Eletroforese em SDS-PAGE; 2) Western blot.

## 6. Discussão

*Bellucia dichotoma* Cogn. é uma planta do tipo arbórea da família Melastomaceae, e com distribuição geográfica em quatro estados da região Norte: Acre, Amazonas, Amapá e Pará. É uma espécie comumente utilizada por comunidades em Santarém-PA no tratamento contra acidentes ofídicos. Utilizam-se principalmente da casca da árvore pelo método de decocção (Moura et al., 2015). A eficácia do extrato da casca de *Bellucia dichotoma*, coletada no Estado do Pará, em bloquear as atividades fosfolipásica  $A_2$ , coagulante e hemorrágica, induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox* foi comprovada, utilizando protocolo de pré-incubação (veneno:extrato), e a atividade edematogênica foi bloqueada utilizando protocolo por via oral, simulando o uso tradicional (Moura et al., 2014). Para validar seu efeito antiofídico, com relação às atividades fosfolipásica, coagulante e proteolítica do veneno de *Bothrops atrox*, o presente estudo foi baseado nas mesmas concentrações do extrato, na mesma via e condições de preparo que a população faz uso, utilizando exemplares de *Bellucia dichotoma* coletados em duas áreas geográficas (Manaus-AM e Santarém- PA).

As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* compreende uma mistura complexa de enzimas tóxicas e proteínas, como por exemplo, fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), metaloproteinases (SVMP) e serinoproteases. As PLA<sub>2</sub> são uma das classes de enzimas, cálcio-dependentes, mais abundantes em venenos de serpentes da família Viperidae e exibem uma grande variabilidade de atividades biológicas, incluindo miotóxica, neurotóxica, cardiotoxica, hemolítica, hemorrágica, hipotensora e anticoagulante (Kini, 2003; Lomonte et al., 2003). No presente trabalho observamos que a aplicação direta dos extratos aquosos oriundos de Manaus (AM) ou de Santarém (PA) no gel não causou inibição significativa da atividade fosfolipásica. Ao contrário, do que foi observado quando utilizamos o protocolo de pré-incubação (veneno:extrato) onde houve inibição de 100% da atividade. Isso demonstra que durante a pré-incubação, os extratos de *B. dichotoma* são capazes de inibir a ação enzimática das PLA<sub>2s</sub> presente no veneno botrópico.

As serinoproteases são importantes para a ação da peçonha e têm a capacidade de converter o fibrinogênio em fibrina diretamente, sem a necessidade da participação da trombina endógena. Eles agem sobre uma variedade de componentes da cascata de coagulação, nos sistemas fibrinolíticos e calicreína-quinina e em células, causando um desequilíbrio do sistema hemostático (SERRANO e MAROUN, 2005). Os extratos aquosos provenientes de Manaus e Santarém, bloquearam 100% a atividade coagulante do veneno de *Bothrops atrox*, quando utilizamos o protocolo de pré-incubação veneno com extrato. Ao avaliarmos o potencial de bloqueio com as mesmas concentrações, porém, aplicando os extratos concomitantemente com o veneno, sem a pré-incubação, o bloqueio máximo foi de 25% para extrato de Manaus e 16% para o de Santarém. No entanto, não houve diferença significativa quando comparado o potencial de inibição entre os dois extratos de *B. dichotoma* avaliados. Por outro lado, quando utilizamos o protocolo sem pré-incubação mas com as concentrações usadas pela população (48,3, 145 e 283,3 mg/kg), o bloqueio foi de 100% para os extratos oriundos de Manaus e de Santarém. Os extratos aquosos de Manaus e Santarém também foram capazes de bloquear a atividade gelatinolítica do veneno de *Bothrops atrox*, como observado na figura, da zimografia. Não houve diferença significativa do potencial de bloqueio desta atividade pelos dois extratos avaliados.



Moura e colaboradores (2014), realizou o perfil fitoquímico da casca de *Bellucia dichotoma* para algumas classes de substâncias e detectou ácidos graxos, flavonoides, terpenoides, taninos condensados e taninos hidrolizados. Os taninos são conhecidos por sua capacidade de quelar íons metais, podendo precipitar proteínas e formar complexos com metais como  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  (Castro et al., 1999; Patiño et al., 2012), o que pode explicar os bloqueios eficazes das atividades fosfolipásica  $A_2$  (cálcio dependente) e atividade coagulante, obtidos no presente estudo, após a pré-incubação do veneno de *B. atrox* com os extratos de *B. dichotoma*. Portanto, os bloqueios de 100% podem ser devido à capacidade dos taninos de não se ligarem especificamente a proteínas do veneno e sim aos íons presentes na composição, durante a pré-incubação, uma ação quelante (Vejayan et al., 2007; Sia et al., 2011). Isso pode ser confirmado pelo resultado de interação da peçonha com os extratos, feitos através de eletroforese seguida de Western blot. Como observado no trabalho de Moura e colaboradores (2014), os perfis da eletroforese com extrato e veneno incorporados pelo método de pré-incubação, e EABd-Stm, apresentaram ausência de bandas protéicas. Os autores sugeriram que essa ausência pode ser resultado da interação entre componentes do extrato, como os taninos, com o veneno, demonstrando uma atividade quelante sobre as proteínas do veneno, sendo semelhante aos nossos resultados. Isso reforça mais uma vez que a metodologia de pré-incubação de venenos de serpentes com extratos vegetais deve ser revista, pois a presença de componentes quelantes nos extratos e nas frações ricas em taninos, que agem retirando ou precipitando compostos com íons em sua composição, superestimam os resultados.

A influência dos fatores ambientais como clima, tipo de solo, local de coleta na biossíntese dos metabólitos secundários e na resposta da atividade biológica apresentada por espécies vegetais, torna necessário estudos que levem em consideração avaliar o efeito de uma determinada espécie coletada em localidades diferentes. Nossos resultados mostram que não houve diferença significativa entre o potencial antiofídico entre os dois espécimes de *Bellucia dichotoma* coletados em locais distintos (Manaus- AM e Santarém-PA). Informação extremamente importante quando se pensa em produção de fitoterápicos. E estes devem ser realizados procurando reproduzir a forma tradicional de uso da espécie para não superestimar os resultados.

## 6. Referências

- ASSAKURA MT, FURTADO MF, MANDELBAUM FR. 1992. **Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*)**. Comp. Biochem. Physiol. v.102. p. 727-732.
- BAUMGRATZ, J. F. A. In: **Lista de espécies da flora do Brasil: *Bellucia dichotoma***. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23691>>. Acesso em: 10 out. 2013.
- BORGES, C.C., SADAHIRO, M., DOS-SANTOS, M.C., 1999. **Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 32, 637- 646.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005. **Guia de vigilância epidemiológica**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6. Ed. Brasília. 816 p.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. **Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso/Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância de Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. 8. Ed. Brasília. 444p.
- CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, S.A., HADDAD, V.J., 2003. **Animais Peçonhentos No Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. Editora Sarvier, São Paulo.
- CASTRO, O., GUTIÉRREZ, J.M., BARRIOS, M., CASTRO, I., ROMERO, M., UMANÃ, E., 1999. **Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales**. Ver. Biol. Trop. 47, 605–616.
- DOS-SANTOS, M.C., 2009. **Serpentes Peçonhentas e Ofidismo no Amazonas**. In: **Animais Peçonhentos No Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. João Luiz Costa Cardoso, Francisco Oscar de Siqueira França, Fan Hui Wen, Ceila Maria Sant'Ana Málaque & Vidal Haddad Jr.. (Org.). Animais Peçonhentos no Brasil. 2ed.São Paulo: Sarvier.

GUTIÉRREZ, J.M., LEÓN, G., ROJAS G., LOMONTE, B., RUCAVADO, A., CHAVES, F., 1988. **Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom.** *Toxicon* 36, 1529–1538.

KINI, R.M., 2003. **Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes.** *Toxicon* 42, 827-840.

L. NAHAS, A. S. KAAIOUTI, H. W. RZEPPA, I. S. SANO and S. MATSUNAGA. 1975. **Effect of heparin on the coagulant action of snake venoms.** *Toxicon* 13, 457-463.

LOMONTE, B., Yamileth, A., Santamaría, C., 2003. **Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms.** *Toxicon* 42, 307–312.

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

MOURA, V. M. 2012. **Efeitos de extratos vegetais sobre atividades biológicas induzidas por peçonhas botrópicas.** 97f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia) Universidade do Oeste do Pará, Santarém, 2012.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A. F.; OLIVEIRA, R. B.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CHALKIDIS, H. M.; SILVA, M. N.; PACHECO, S.; MOURÃO, R. H. V. 2013. **Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts.** *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 7, p. 2330-2337.

MOURA, V. M.; BEZERRA, A. N. S.; MOURÃO R. H. V.; LAMEIRAS, J. L. V.; RAPOSO J. D. A.; SOUSA, R. L.; BOECHAT, A. L.; OLIVEIRA, R. B.; CHALKIDIS, H. M.; DOS-SANTOS, M. C. 2014. **A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods.** *Toxicon* 85, 59–68.

PATIÑO, A.C., LÓPEZ, J., ARISTIZÁBAL, M., QUINTANA, J.C., BENJUMEA, D., 2012. **Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas**

(Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica* 32, 365–374.

OTERO, R., R. J.; FONNEGRA E JIMÉNEZ, S. L. 2000. **Plantas utilizadas contra mordeduras de serpientes em Antioquia y Chocó, Colombia. Universidad de Antioquia.** Medellín, p. 402.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. **Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved.** *Toxicon*, v.45, n.8, p. 1115-1132, 2005.

SIA, F.Y., VEJAYAN, J., JAMUNA, A., AMBU, S., 2011. **Efficacy of tannins from *Mimosa pudica* and tannic acid in neutralizing cobra (*Naja kaouthia*) venom.** *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 17, 42–48.

SILVA, J. O.; ALMEIDA, S. S. M. S.; Souto, R. N. P.. **Avaliação da Eficácia do Extrato Aquoso de *Brosimum guianense* sobre o efeito Induzido pelo Veneno de *Bothrops atrox*.** 2011. Dissertação (Mestrado em CIÊNCIAS DA SAÚDE) - Universidade Federal do Amapá.

VEJAYAN, J., IBRAHIM, H., OTHMAN, I., 2007. **The potential of *Mimosa pudica* (mimosaceae) against snake envenomation.** *J.Trop. For. Sci.* 19, 189–197.

WHO. 2007. **Rabies and envenomings. A neglected public health issue.** Available: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241563482\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241563482_eng.pdf)

WHO. 2009. **Snakebite.** Available: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/snakebites/en/index.html](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/index.html).

## 7. Cronograma

Nº	Descrição	Ago 2014	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2015	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	- Atualização da literatura	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	- Aperfeiçoamento das técnicas laboratoriais.	R	R	R									

- Coleta do material vegetal e preparação dos extratos			R	R	R							
- Realização dos ensaios fosfolipase A <sub>2</sub> e coagulação					R	R						
- Realização da atividade proteolítica/zimografia							R					
- Eletroforese em SDS-PAGE e Western-blot								R	R			
- Apresentação de seminário (reunião do grupo)					R					R		
- Elaboração do Resumo e Relatório Final											R	R
- Preparação da Apresentação Final para o Congresso											R	R

R = Realizado; X = Não realizado.