



FORMULÁRIO PARA RELATÓRIO FINAL

1. Identificação do Projeto

Título do Projeto PIBIC/PAIC

Verificação do potencial antiofídico dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* Cogn., oriundos do Pará e Amazonas, frente às atividades fosfolipásica A₂, coagulante e “enzimática” da peçonha de *Bothrops atrox*

Orientador

Professora Doutora Maria Cristina dos Santos

Aluno

Luana Yamille Andrade de Souza

2. Informações de Acesso ao Documento

2.1 Este documento é confidencial?

SIM

NÃO

2.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?

SIM

NÃO

2.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

SIM

NÃO

2.4. Em caso de liberação parcial, quais dados podem ser liberados? Especifique.

3. Introdução

O uso das plantas tem tido grande importância no tratamento contra doenças desde os tempos antigos. Na verdade, na medicina tradicional, plantas medicinais e formulações à base de plantas desempenham um papel crucial na prevenção e mitigação de diferentes doenças humanas (Asad et al., 2011; Nabavi et al., 2015). O conhecimento tradicional também é utilizado para acidentes com animais peçonhentos em todas as partes do mundo muito antes da invenção dos antivenenos (Ambikabothly et al., 2011). As pessoas



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

têm aceito as propriedades antiofídicas das plantas mesmo sem saber de seu valor científico verdadeiro, pois os extratos vegetais possuem mais de uma propriedade química, o que fornece uma fonte riquíssima de compostos farmacologicamente ativos (Ambikabothly et al., 2011). Os mecanismos exatos da ação de componentes de extratos das plantas permanecem em grande parte elusiva, no entanto, alguns compostos como o ácido rosmarínico (Ticli et al., 2005; Aung et al., 2010), quercetina (Nishijima et al., 2009), e glicirrizina (Assafim et al., 2006) podem inibir atividades biológicas de alguns venenos de serpentes *in vivo* e *in vitro*.

Bellucia dichotoma Cogn. é uma planta pertencente à família Melastomataceae, de porte médio, chegando a até 10 m de altura. Produz frutos comestíveis e está distribuída em quatro Estados da Região Norte: Acre, Amapá, Amazonas e Pará (Baumgratz, 2013). É popularmente conhecida como goiaba-de-anta devido aos seus frutos serem muito comidos pelas antas e outros animais. *B. dichotoma* é utilizada no tratamento contra acidentes ofídicos por moradores de comunidades em Santarém, no Pará, pelo preparo de chá com as cascas da planta (Moura et al., 2013; Moura et al., 2014; Moura et al., 2015). Em trabalhos anteriores com *B. dichotoma* coletada em Santarém nosso grupo observou que o extrato aquoso preparado apresentou uma atividade antiedematogênica significativa frente ao veneno de *Bothrops atrox*. À esta serpente é atribuída a maioria dos casos de acidentes ocorridos na Região Norte.

Diante do exposto, o objetivo do primeiro projeto de PIBIC foi comparar os espécimes de *Bellucia dichotoma* de regiões geográficas distintas afim de verificar a existência de diferenças significativas quanto aos seus potenciais antiofídicos sob dois protocolos – pré incubação (veneno: extrato), e sem pré-incubação. Os espécimes foram coletados em Santarém-Pará e em Manaus-Amazonas e testados quanto as atividades fosfolipásica A₂, coagulante e enzimática do veneno de *B. atrox*. Os resultados demonstraram que sem o processo de pré-incubação ambos os extratos aquosos não inibiram significativamente as atividades do veneno. Todavia, quando utilizado o protocolo de pré-incubação as atividades do veneno foram retardadas ou inibidas em 100%, indicando que há uma interação de componentes químicos, dos dois exemplares da planta, com proteínas do veneno. A maioria dos trabalhos que estuda o potencial antiofídico de plantas, das quais as pessoas fazem uso, atribuem essa interação aos compostos fenólicos, especificamente os taninos. Os taninos estão presentes nos vegetais e são capazes de formar complexos com proteínas, o que fortemente sugere que



estes formam complexos com as proteínas do veneno, inibindo assim suas atividades. Como continuidade do trabalho decidimos, para o presente estudo, analisar os perfis fitoquímicos de forma qualitativa nos dois exemplares de *Bellucia dichotoma*.

4. Justificativa

Um certo número de plantas é utilizado na medicina popular no combate aos efeitos dos acidentes ofídicos no mundo todo, principalmente em regiões onde o acesso à soroterapia é restrito ou inexistente. Na Região Amazônica a utilização de preparados oriundos de plantas em acidentes ofídicos ainda é bastante comum, muitas vezes a única alternativa para muitas comunidades. Por exemplo, o extrato aquoso das cascas de *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) é usado tradicionalmente como decocção para tratamento de picada de serpente e sua eficácia já foi confirmada em trabalhos anteriores, realizados por alguns dos pesquisadores do nosso grupo (Moura et al., 2013; Moura et al., 2014; Moura et al., 2015). Essa espécie vegetal apresenta distribuição geográfica em quatro Estados da região Norte: Acre, Amazonas, Amapá e Pará (BAUMGRATZ, 2013). O estudo continuou com a comparação do potencial antiofídico dos extratos aquosos de *B. dichotoma* coletados em Manaus e Santarém, preparados de acordo com forma tradicional (decocção) frente às atividades testadas *in vitro* do veneno de *Bothrops atrox* e verificar o seu perfil fitoquímico. A renovação permitiu a elaboração de novos testes frente às atividades coagulante e enzimáticas para que possamos publicar os dados comparativos. Além disso, foram verificados os perfis fitoquímicos dos dois espécimes coletados para observar se há diferença entre os componentes químicos, uma vez que são plantas da mesma espécie, mas de localidades geográficas diferentes.

5. Objetivos

5.1. 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*.

5.2. Objetivos específicos:

- 1) Preparar extratos aquosos provenientes das cascas de *Bellucia dichotoma* de acordo com o método tradicional;



UFAM

- 2) Comparar os efeitos bloqueadores dos extratos aquosos de *B. dichotoma* coletada em dois locais distintos (Manaus-AM e Santarém-PA), frente às atividades coagulante e proteolítica (zimografia) induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*;
- 3) Avaliar a ação direta dos extratos de *B. dichotoma* sobre o veneno de *B. atrox* por eletroforese (SDS-PAGE) e Western Blot;
- 4) Determinar os perfis fitoquímicos dos extratos de *B. dichotoma* coletada em Manaus-AM e Santarém-PA.

6. Metodologia

6.1 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^o 268216. Uma cópia da exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, sob o número de registro 10071. Os exemplares foram coletados na mesma época do ano.

6.2. 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.

6.3. Determinação das classes de constituintes químicos dos extratos

A análise dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* de Manaus (EABd-Mao) e Santarém (EABd-Stm) numa concentração de 4 mg/mL para identificar seus constituintes químicos seguiu a metodologia descrita por Matos (1997). Foi analisado qualitativamente a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: antocianidinas, antocianinas, catequinas, fenóis, flavonas, flavonóis, flavonoides flavanonas, leucoantocianidinas, saponinas, taninos e xantonas.

6.4. Obtenção do veneno de *Bothrops atrox* e do soro antibotrópico (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.

6.5. Atividade fosfolipásica

A avaliação da atividade da Fosfolipase A_2 (PLA₂) 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



UFAM

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 \pm desvio padrão da média.

6.6. Atividade coagulante

A atividade coagulante foi calculada de acordo com a metodologia de Theakston e Reid (1983). Sendo expressa pelo tempo médio de coagulação, em segundos, de 200 μ L de plasma previamente aquecidos 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 μ L). 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.

6.7. 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



UFAM

descritas anteriormente, porém, com 2 mg/mL de gelatina 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).

6.8. 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 antibotrópico – 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_2O_2 , a 30%. A reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água destilada.

6.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm 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 foi de $\alpha = 0,05$.

7. Resultados e Discussão

Na tabela 1 estão expressas as classes de metabolitos secundários que foram detectados nos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* oriundos de Manaus e Santarém.

Tabela 1. Teste fitoquímico qualitativo para detecção de metabolitos secundários nos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* (EABd-Mao e EABd-Stm).

| Classes de metabólitos secundários | EABd-Mao | EABd-Stm |
|------------------------------------|----------|----------|
| Antocianidinas | - | - |
| Antocianinas | - | - |
| Auronas | - | - |
| Catequinas | + | + |
| Chalconas | - | - |
| Fenóis | + | + |
| Flavonoides | + | + |
| Flavanonas | + | + |
| Flavonas | + | + |
| Flavanonóis | + | + |
| Flavonóis | + | + |
| Leucoantocianidinas | - | - |
| Saponinas | + | + |
| Taninos | + | + |
| Xantonas | - | - |

(-): ausência; (+) presença

Ao comparar os perfis fitoquímicos dos dois extratos (EABd-Mao e EABd-Stm) os resultados mostram que não houve diferenças entre os dois perfis. Moura e colaboradores (2014) analisaram o perfil fitoquímico da casca de *Bellucia dichotoma*, coletada em Santarém, para algumas classes de substâncias e detectaram ácidos graxos, flavonoides, terpenoides, taninos condensados e taninos hidrolisados. Também analisaram o teor dos compostos fenólicos por meio de

ensaios colorimétricos e observaram um alto teor de taninos condensados. 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*. O bloqueio observado foi mais eficaz do que o tratamento padrão com o soro antiofídico (SAB), que reduziu 50,9% a atividade fosfolipásica causada pelo veneno. Todavia, os extratos quando incorporados 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 de *B. dichotoma* em todas as concentrações avaliadas (Fig. 2).

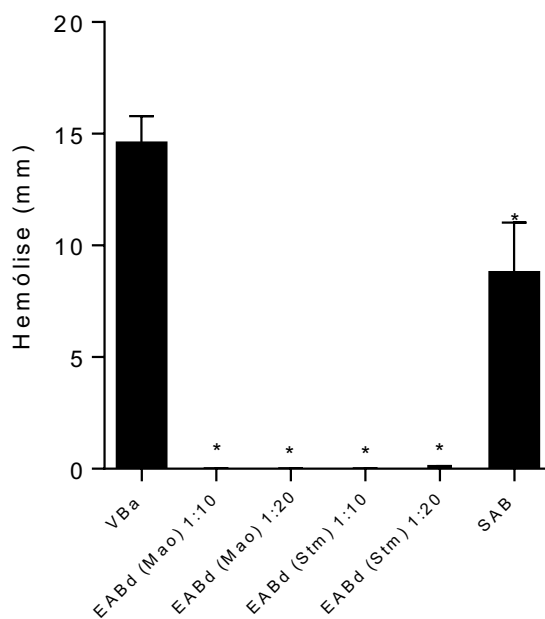


Figura 01. Potencial de bloqueio dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* frente à atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops atrox* pelo protocolo de pré-incubação, nas proporções de 1:10 e 1:20 (veneno:extratos, m:m). * $p < 0,05$ vs. Controle (VBa) e salina. Teste de Tukey, $n = 4$ / por grupo.

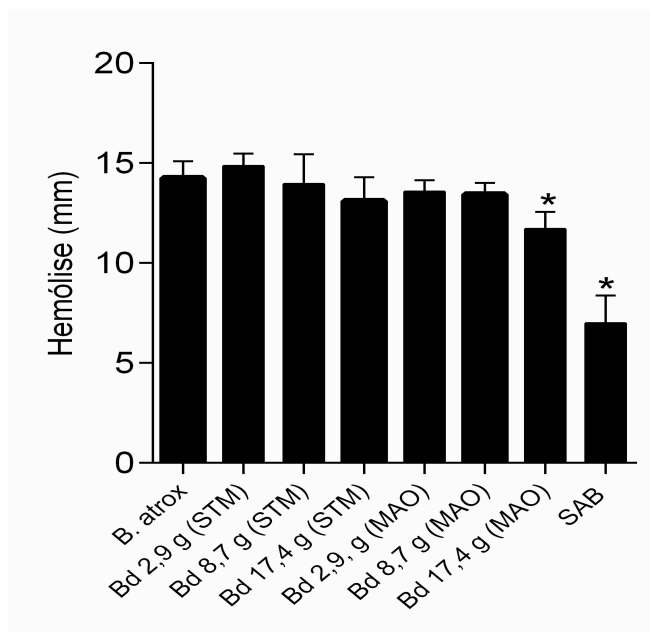


Figura 02. Efeito bloqueador dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma*, sem pré-incubação, testados em diferentes doses de acordo com a prática popular. *Inibição significativa do extrato aquoso de Manaus em relação ao controle positivo (veneno de *Bothrops atrox*).

O veneno de serpentes do gênero *Bothrops* compreende uma mistura complexa de enzimas tóxicas e proteínas, por exemplo, fosfolipase A₂ (PLA₂), metaloproteinases (SVMP) e serinoproteases. As toxinas do veneno botrópico afetam principalmente os tecidos musculares e coagulação do sangue, e os sintomas incluem: dor, inchaço e sangramento (local da picada e mucosas), e nos casos em que podem ocorrer complicações: bolhas, gangrena, choque e insuficiência renal aguda (da Silva et al., 2012). As PLA₂ são um grupo de toxinas enzimáticas cálcio-dependentes abundantemente presente nos venenos de serpentes. São responsáveis pela expressão de mediadores inflamatórios, vasodilatadores e vasoconstritores, como histamina, quininas, fator de ativação de plaquetas, catecolaminas, dopamina, óxido nítrico e endotelinas durante o envenenamento (Huang & Lee, 1984; Thamaree et al., 2000). 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) no qual foi observado inibição de 100% da atividade.

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 antibotrópico inibiram 100% a atividade coagulante do veneno de *B. atrox* quando utilizado o protocolo de pré-incubação (veneno:extratos, m:m) (Tabela 2). 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 antibotrópico.

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) |
| Com pré-incubação | | | |
| <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* |
| Sem pré-incubação | | | |
| <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.

Proteases estão naturalmente presente nos venenos de serpentes e são responsáveis por alguns efeitos locais e sistêmicos do envenenamento. Essas proteases são geralmente capazes de promover a hidrólise de proteínas do fibrinogênio em fibrina, o que resulta em fibrinólise e incoagulabilidade do sangue (Costa, 2010). Essa atividade fibrinogenolítica dos venenos de serpentes é geralmente deliberado por serino e metaloproteases (Swenson & Markland, 2005).

As serinoproteases podem promover proteólises não específicas ou ativação/inativação específica dos fatores de coagulação envolvidos na agregação de plaquetas, coagulação e ativação do plasminogênio (Braud et al., 2000). A maioria das serinoproteases tem atividade da enzima “thrombin-like” as quais competem com a trombina na hidrólise do fibrinogênio. No entanto, ao contrário da trombina, as “thrombin-like” não são inibidas pela heparina, e não promovem a ativação do fator XIII de coagulação do sangue (Serrano; Maroun, 2005; Costa, 2010).

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 3. Quando comparado o perfil do veneno de *B. atrox* com as amostras pré-incubadas de veneno mais o extrato de Manaus e 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 Blue e foram fracamente reveladas pelos anticorpos presentes no SAB.

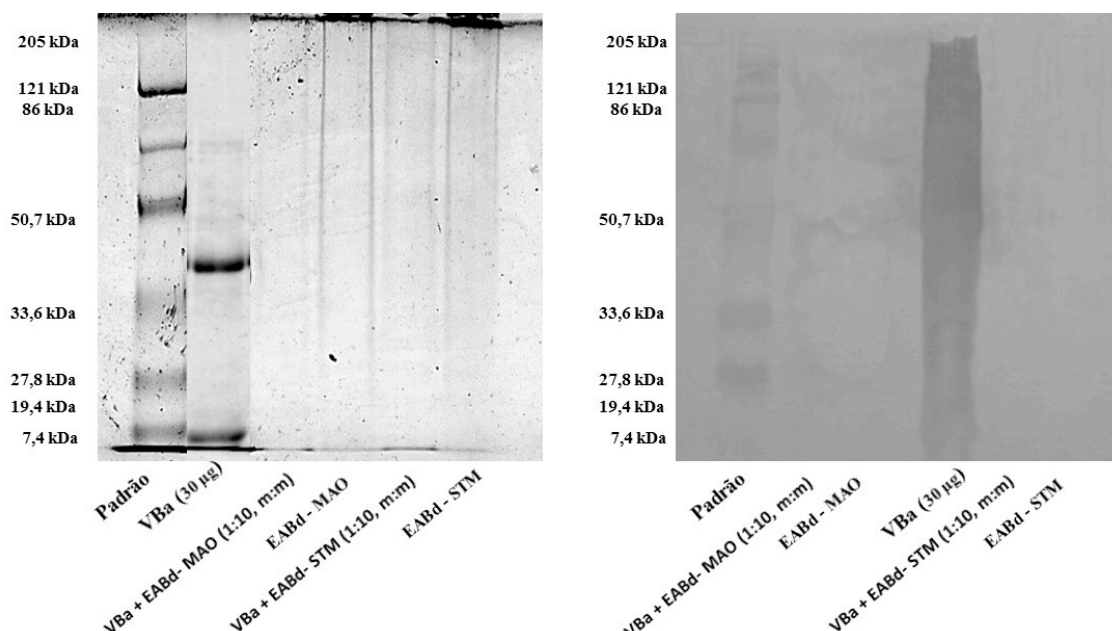


Figura 03: Interação entre os extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* e o veneno de *Bothrops atrox*. Onde, 1) Eletroforese em SDS-PAGE; 2) Western Blot.

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 (Fig. 4).

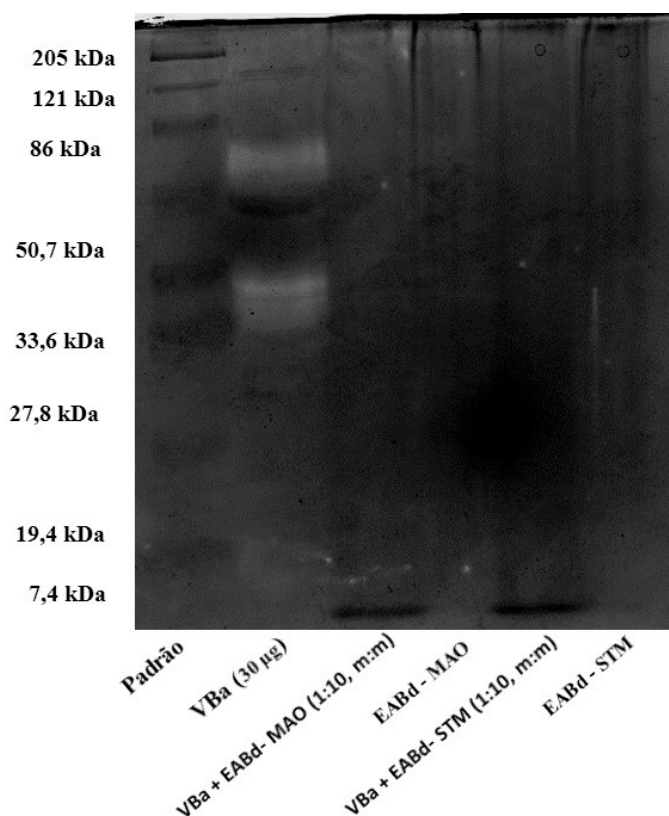


Figura 4. Zimografia da atividade gelatinolítica do veneno de *Bothrops atrox* e do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* provenientes de Santarém - PA e Manaus - AM. As bandas sem coloração no gel indicam a presença de enzimas no veneno de *B. atrox* ou no extrato aquoso de *B. dichotoma* com atividade sobre a gelatina presente no gel.

Os taninos são conhecidos por sua capacidade de quelar íons metálicos, 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 e atividade coagulante (cálcio dependentes), obtidos no presente estudo, após a pré-incubação do veneno de *Bothrops atrox* com os extratos de *Bellucia dichotoma*. Portanto, os bloqueios de 100% podem ser devidos à capacidade dos taninos de não se ligarem especificamente a proteínas do veneno e sim aos íons presentes na composição ou cofatores, durante a pré-incubação, uma ação quelante (VeJayan et al., 2007; Sia et al., 2011). Isso pode ser confirmado pelos resultados da interação dos componentes do veneno com os



UFAM

extratos, obtidos na eletroforese e no Western Blot. Como observado no trabalho de Moura e colaboradores (2014), os perfis eletroforéticos com extrato e veneno incorporados pelo método de pré-incubação, e EABd-Stm, apresentaram ausência de bandas proteicas.

8. Referências

- Ambikabothu, J., Ibrahim, H., Ambu, S., Chakravarthi, S., Awang, K., Vejjayan, J. Efficacy evaluations of *Mimosa pudica* tannin isolate (MPT) for its anti-ophidian properties. 2011. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 257-262
- Asad, M. H. H. B., Murtaza, G., Siraj, S.; Khan, S. A., Azhar, S., Hussain, M. S. et al. 2011. Enlisting the scientifically unnoticed medicinal plants of Pakistan as a source of novel therapeutic agents showing anti-venom activity. *African Journal of Pharmacy* Vol. 5 (20), pp. 2292-2305.
- Assafim, M., Ferreira, M. S., Frattani, F. S., Guimarães, R. Q. M., Zingali, R. B. 2006. Counteracting effect of glycyrrhizin on the hemostatic abnormalities induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *British Journal of Pharmacology*, 148, 807-813.
- Assakura M.T., Furtado M.F., Mandelbaum F. R. 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.
- Aung, H. T., Nikai, T., Niwa, M., Takaya, Y. Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage. 2010. *J Nat Med*, 64:482-486 doi10.1007/s11418-010-0428-3.
- 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.



UFAM

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.

Braud, S., Bon, C., Wisner, 2000. A. Snake venom proteins acting on hemostasis, *Biochimie*, 82, 851-859.

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., G, 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.

Costa, J. O., Fonseca, K. C., Garrote-Filho, M. S., Cunha, C. C., de Freitas, M. V., Silva, H. S., Araújo, R. B., Penha-Silva, N., de Oliveira, F. 2010. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant látex and snake venoms. *Biochimie*, 92, 1760-1765.

Da Silva, M. L., Marcussi, S., Fernandes, R. S., Pereira, P. S., Januário, A. H., França, S. C., da Silva, S. L., Soares, A. M., Lourenço, M. V. 2012. Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. *Pharmaceutical Biology*, 50 (3); 366-375

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.



UFAM

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.

Huang, H.C., Lee, C.Y. 1984. Isolation and pharmacological properties of phospholipases A₂ from *Vipera russelli* (Russell's viper) snake venom. *Toxicon*, 22 (2), 207-17.

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

Lomonte, B., Yamileth, A., Santamaría, C., 2003. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. *Toxicon*, 42, 307–312.

Mors, W. B.; Nascimento, M. C.; Pereira, B. M. R.; 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., Souza, 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.



UFAM

Moura, V. M., da Silva, W. C. R., Raposo, J. D. A., Freitas-de-Sousa, L. A., Dos-Santos, M. C., Oliveira, R. B., Mourão, R. H. V. 2016. *Journal of Ethnopharmacology*, 183, 136-142.

Nabavi, S. F., Habtemariam, S., Ahmed, T., Sureda, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. M. 2015. *Nutrientes*, 7, 7708-7728; doi:10.3399/nu7095361

Nahas, L., Kaaiouti, A. S., Rzeppa, H. W., Sano, I. S. and Matsunaga, S. 1975. Effect of heparin on the coagulant action of snake venoms. *Toxicon*, 13, 457-463.

Nishijima, C. M., Rodrigues, C. M., Silva, M. A., Lopes-Ferreira, M., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C. A. 2009. Anti-hemorrhagic Activity of Four Brazilian Vegetable Species Against *Bothrops jararaca* Venom. 2009. *Molecules*, 14, 1072-1080; doi:10.3390/molecules14031072.

Patiño, A. C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J. C., Benjumea, D., 2012. Efecto inhibitorio de extractos de *Renalmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica*, 32, 365–374.

Otero, R., Fonnegra, R., Jimenez, S. L. 2000. Plantas medicinales utilizadas em mordeduras de serpientes en Antioquia y Chocó, Colombia. Universidad de Antioquia. Medellín, p. 402.

Santosh, M. S., Hemshekhar, M., Sunitha, K., Thushara, R. M., Jnaneshwari, S., Kemparaju, K., Girish, K. S. 2013. Snake Venom Induced Local Toxicities: Plant Secondary Metabolites as na Auxiliary Therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13, 106-123.

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.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

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.

Sousa, L. F., Nicolau, C. A., Peixoto, P. S., Bernardoni, J. L., Oliveira, S. S. et al. (2013). Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. PLoS Negl Trop Dis, 7 (9): e2442. doi:10.1371/journal.pntd.0002442.

Swenson, S., Markland, F. S. 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. Toxicon, 45, 1021-1039.

Thamaree, S., Sitprija, V., Leepipatpaiboon, S., Witayalertpunya, S., Thaworn, N. 2000. Mediators and renal hemodynamics in Russell's viper envenomation. J Nat Toxins, 9 (1), 43-8.

Ticli, F. K., Hage, L. I. S., Cambraia, R. S., Pereira, P. S., Magro, A. J., Fontes, M. R. M. et al. 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. Toxicon, 46, 318-327.

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

WHO. 2009. Snakebite. Available:

http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/index.html.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

9. Cronograma de Atividades

| Nº | Descrição | Ago | Set | Out | Nov | Dez | Jan | Fev | Mar | Abr | Mai | Jun | Jul |
|----|---|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | | 2015 | | | | | 2016 | | | | | | |
| 1 | Revisão da Literatura | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| 2 | Aperfeiçoamento das técnicas laboratoriais | R | R | R | | | | | | | | | |
| 3 | Coleta do material vegetal e preparação dos extratos | | | R | R | R | | | | | | | |
| 4 | Realização dos ensaios fosfolipase A ₂ e coagulação | | | | | R | R | | | | | | |
| 5 | Realização da atividade proteolítica/zimografia | | | | | | | R | | | | | |
| 6 | Eletroforese em SDS-PAGE e Western-blot | | | R | R | | | | | | | | |
| 7 | Apresentação de seminário (Reunião do grupo) | | | | | | | | | | | | R |
| 8 | - Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória) - Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória) | | | | | | | | | | | | R; X |

R = Realizado; X= Não realizado.