



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA- PPGBIOTEC**  
**LABORATÓRIO DE IMUNOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOFÍDICO DO EXTRATO**  
**AQUOSO DE *Bellucia dichotoma* Cogn. (MELASTOMATACEAE)**  
**ELABORADO DE ACORDO COM O USO TRADICIONAL**

**VALÉRIA MOURÃO DE MOURA**

**Manaus, AM**  
**Agosto de 2016**

**VALÉRIA MOURÃO DE MOURA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOFÍDICO DO EXTRATO  
AQUOSO DE *Bellucia dichotoma* Cogn. (MELASTOMATACEAE)  
ELABORADO DE ACORDO COM O USO TRADICIONAL**

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristina dos Santos

Coorientadora: Professora Doutora Rosa Helena Veras Mourão

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora, junto ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia para Saúde

**Manaus, AM  
Agosto de 2016**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M929a Moura, Valéria Mourão de  
Avaliação do potencial antifúngico do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) elaborados de acordo com o uso tradicional / Valéria Mourão de Moura. 2016  
108 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Cristina dos Santos  
Orientador: Rosa Helena Veras Mourão  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Plantas antifúngicas. 2. *Bellucia dichotoma*. 3. *Bothriopsis atrox*.  
4. conhecimento tradicional. I. Santos, Maria Cristina dos II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título



### 201ª. ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 25 de agosto de 2016 às 14h, no auditório da Biotecnologia, Bloco M, setor Sul – UFAM, **Valéria Mourão de Moura**, defendeu sua Tese de Doutorado intitulada: “**Avaliação do potencial antibiofídico dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* Cong. (Melastomataceae) elaborados de acordo com uso tradicional**”.

#### Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dra. Maria Cristina dos Santos - (UFAM Presidente)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dr. Andreimar Martins Soares - (FIOCRUZ - RO)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa – (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dra. Cinthya Iamille Frithz. Brandão de Oliveira - (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dra. Michella Bezerra Lima - (UEA)	Aprovado (X) Reprovado ( )	

Manaus, 25 de agosto de 2016.

**Resultado Final:** Aprovado (X)  
Reprovado ( )

\_\_\_\_\_  
Coordenador do PPGBIOTEC - UFAM

## *Dedico:*

- *Ao meu amor Cláudio Monteiro Junior, companheiro de vida e de sonhos, que sempre acredita na minha capacidade de vencer, me motiva com seu pensamento positivo e me faz ter a certeza de que juntos conseguiremos tudo!*
  
- *Aos meus pais Heloiza Mourão e Luis Marques, por serem os responsáveis pela minha essência, por me ensinarem a sempre dar o melhor de mim, por todo amor e carinho dedicado em todos esses anos de minha vida.*
  
- *As minhas irmãs Vanessa, Bruna e Fernanda, por sempre acreditarem no meu potencial, e por fazerem os meus dias mais felizes.*
  
- *A minha tia Rosa Mourão, grande incentivadora dos meus estudos, por todo companheirismo desde o início de minha vida acadêmica e por sempre acreditar que sou capaz de ir mais longe!*

## Agradecimentos

- ✚ Agradeço à minha orientadora, Doutora **Maria Cristina dos Santos**, por todo conhecimento repassado, por ser exemplo de ética e compromisso. Pela paciência nas correções e discussões dos trabalhos durante esses anos e por ter sido sempre tão acessível. Agradeço por acreditar na minha capacidade mesmo antes de me conhecer e ter se tornado essa grande “Mãe científica” e amiga! MUITÍSSIMO obrigada.
- ✚ À minha coorientadora, Doutora **Rosa H. Veras Mourão**, grande motivadora de minhas pesquisas, por ser uma das pessoas mais positivas que eu conheço. Pelas oportunidades concedidas, por sempre incentivar minhas ideias, e pela valiosa ajuda nos experimentos in vivo. Serei eternamente grata!
- ✚ A todos os integrantes do Laboratório de Imunoquímica, (**Rafael Sousa, Luana Santana, Carolina Scheffer, Thaís Martins, José Dantas, Rafael Oliveira**) sempre prontos a ajudar, como uma grande família!
- ✚ As amigas companheiras de experimentos e conversas, **Juliana Lameiras, Thaís da Silva** e **Ilia Gilmara**, meus dias no laboratório não seriam os mesmos sem vocês. Obrigada por todos os momentos de estudos e cumplicidade!
- ✚ Ao Professor Doutor **Boechat**, pelos valiosos ensinamentos sobre estatística, por finalmente me fazer entendê-la! Obrigada por todo conhecimento compartilhado.
- ✚ Às minhas pupilas **Norah Costa** e **Luana Yamile**, que além do apoio na parte experimental do trabalho me deram a honra de poder orientá-las.
- ✚ A todos os integrantes do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental - LABBEx, especialmente a **Juliana Raposo, Sandra Sarrazin** e **Luciana Sousa**, as quais sempre estiveram disponíveis para discutir sobre metodologias ou quaisquer outros assuntos acadêmicos.
- ✚ À Unidade de Experimentação Animal do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, pela concessão dos animais utilizados no estudo.
- ✚ À toda família “Labcroiana” do Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (**Yumi, Danila, Neto, Lu** e **Wani**), e, especialmente ao Doutor **Milton Nascimento, Soninha** e **Geyse** pelas discussões durante o processo de isolamento das substâncias, principalmente pela paciência com a Bióloga e por não me deixarem desistir!

- ✚ A todos do Laboratório de Morfologia Quantitativa, em especial ao Doutor **Oscar Costa** por disponibilizar seus equipamentos e espaço durante a realização de experimentos in vitro.
- ✚ Ao **Júlio Souza**, pela valiosa ajuda nas coletas da espécie vegetal *Bellucia dichotoma*.
- ✚ Ao professor **Hipócrates Chalkidis** do Laboratório de Pesquisas Zoológicas, pela parceria na obtenção do veneno de *Bothrops atrox*.
- ✚ À banca de qualificação composta pelos Doutores **Cecília Nunez**, **Silvania Furtado** e **Fernando Marques**, pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento da tese.
- ✚ Ao Doutor **Lioney Cabral**, pela ajuda fundamental na finalização dessa jornada. Por finalmente me fazer entender o verdadeiro sentido da frase “O ótimo é inimigo do bom”. Os seus ensinamentos mudaram a minha vida profissional e pessoal. Obrigada!
- ✚ Ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, em nome do coordenador Dr. **Gustavo Nunes**, pela oportunidade de qualificação acadêmica. Agradeço também a **Nubiane** por todo auxílio prestado durante os quatro anos de Doutorado.
- ✚ Ao CNPq pela concessão de bolsa de doutorado (no. 151279/2012-8).
- ✚ À Fapeam pelas bolsas de incentivo à publicação científica.
- ✚ Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTOX) pelo suporte financeiro (ref. no. 573790/2008-6/CNPq, 1217/2011/CAPES)
- ✚ A todos das comunidades ribeirinhas em nome do **Senhor Reinaldo**, um grande motivador de minhas pesquisas. Agradeço pelo conhecimento compartilhado e por permitir que esse conhecimento seja melhorado e devolvido às comunidades.
- ✚ A todos que colaboraram na minha campanha “Plantas da Amazônia contra o veneno de jararaca”, por juntos permitirem a realização de algo que acho primordial na pesquisa científica, que é o retorno dos resultados às comunidades.
- ✚ Enfim, agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. **OBRIGADA!**

*“Nunca subestime as informações sobre plantas medicinais oriundas do saber popular, porém não as repasse de volta ao povo sem saber, cientificamente, se a atividade atribuída à planta realmente existe e se seu grau de toxicidade não irá submeter o usuário a riscos desnecessários”.*

---

*Francisco José de Abreu Matos*





## RESUMO

MOURA, Valéria Mourão. Avaliação do potencial antiofídico do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* cogn. (Melastomataceae) elaborado de acordo com o uso tradicional. 2016. 108p. Tese de doutorado em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia para a saúde. Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Manaus, Amazonas, 2016.

*Bothrops atrox* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos na região Norte do Brasil e seu envenenamento se caracteriza por lesões locais intensas e distúrbios hemostáticos. Em algumas regiões do país onde o atendimento dos acidentados por serpentes é precário, as plantas medicinais têm se apresentado como alternativa de tratamento ou como um complemento na falta de recursos soroterápicos. Este trabalho teve por objetivo principal avaliar o potencial antiofídico dos extratos aquosos das cascas de *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) elaborados de acordo com uso tradicional. Inicialmente, foi investigada a ação bloqueadora do extrato aquoso das cascas de *B. dichotoma* (EABd) frente às principais atividades locais (Hemorragica, fosfolipásica, edematogênica) induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox* (VBa), comparando os métodos de pré-incubação e de uso tradicional. As concentrações dos compostos fenólicos (taninos e flavonoides), no extrato, foram determinadas por ensaios colorimétricos. Para verificar a ação de EABd sobre o VBa foram realizadas eletroforese em SDS-PAGE, Zimografia e *Western-blot*. Como a distribuição geográfica, tipo de solo e condições climáticas, podem influenciar diretamente no potencial biológico de uma espécie, avaliamos a eficácia do bloqueio de *B. dichotoma* coletada em dois locais distintos (Manaus-AM e Santarém- PA), frente as atividades edematogênica, fosfolipásica, desfibrinante e coagulante do veneno de *B. atrox*. Além de verificar o potencial antioxidante e a citotoxicidade dos extratos frente a fibroblastos humanos da linhagem MRC-5. Na tentativa de correlacionar o potencial antiofídico de *B. dichotoma* com seus constituintes químicos, foi realizado um desenvolvimento preliminar de um método por HPLC-DAD para isolamento dos constituintes majoritários do extrato aquoso das cascas de *B. dichotoma*. A eficácia dos compostos isolados no bloqueio da atividade hemorrágica e fosfolipásica A<sub>2</sub> foi avaliada, inicialmente pelo protocolo de pré-incubação na proporção de 1:1 (veneno: compostos, m:m). Apartir dos resultados obtidos, foi possível concluir que o conteúdo fenólico de EABd apresentou maiores concentrações de taninos (condensados e hidrolisáveis) em relação aos flavonoides. Os bloqueios totais observados neste trabalho, após a pré-incubação, podem ser devido à presença desses taninos no extrato. No entanto, o EABd, quando administrado tradicionalmente (via oral), foi eficaz em bloquear a atividade edematogênica induzida pelo VBa e teve um efeito adicional a ação do Soro antiofídico na inibição dessa atividade. Os conteúdos de compostos fenólicos (fenóis totais, taninos totais e taninos hidrolisáveis), foram superiores no extrato de *B. dichotoma* coletado em Manaus, porém, essa diferença não influenciou o potencial antiofídico apresentado pelos extratos aquosos coletados em Manaus-AM e Santarém-PA. Os extratos apresentaram um alto potencial antioxidante e não foram considerados tóxicos frente às células MRC-5. Um composto da fração FBd1 oriunda do extrato aquoso de *B. dichotoma* bloqueou 100% a atividade hemorrágica do veneno de *B. atrox* (pré-incubação), no entanto, o composto isolado encontra-se em fase de elucidação estrutural.

**Palavras-chave:** Plantas antiofídicas, *Bellucia dichotoma*, *Bothrops atrox*, antiveneno, conhecimento tradicional.

## ABSTRACT

MOURA, Valéria Mourão. Evaluation of the anti-snakebite potential of aqueous extract of *Bellucia dichotoma* cogn. (Melastomataceae) prepared according to the traditional method. 2016. 108p. PhD thesis in Biotechnology. Area of concentration: biotechnology for health. Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Manaus, Amazonas, 2016.

*Bothrops atrox* is responsible for the majority of snakebites in northern Brazil and its poisoning is characterized by intense local and hemostatic disorders injuries. In some regions of the country where the care of accident victims by snakes is precarious, medicinal plants have been presented as an alternative treatment or as a complement in the absence of resources soroterápicos. The main goal of this study was to evaluate the anti-snakebite potential of aqueous extract of the bark of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) prepared in accordance with the traditional method. Initially, we investigated the potential of the extract (AEBd) to inhibit the major local (hemorrhagic, phospholipase A<sub>2</sub> and edema-inducing) activities of *Bothrops atrox* venom (BaV) and compared the pre-incubation method with the traditional method used in folk medicine. The concentrations of the phenolic components (tannins and flavonoids) in the extract were determined by colorimetric assays. To assess the action of AEBd on BaV, SDS-PAGE electrophoresis, zymography and Western-blot were carried out. As geographic distribution, soil type and climate can directly influence the biological potential of a species, we compared the potential of *B. dichotoma* collected in two different locations (Manaus, AM, and Santarém, PA) to inhibit the edema-inducing, phospholipase A<sub>2</sub>, defibrinating and coagulant activities of BaV. We also investigated the antioxidant potential and cytotoxicity of the extracts using human fibroblasts (MRC-5 cell line). In an attempt to correlate the anti-snakebite potential of *B. dichotoma* with its chemical components, a preliminary HPLC-DAD method was developed to isolate the major components of the extract. The efficacy of the isolated components in inhibiting the hemorrhagic and phospholipase A<sub>2</sub> activities of the venom was evaluated initially using a pre-incubation protocol and a venom:component ratio of 1:1 (w/w). Our results show that AEBd has a higher concentration of (condensed and hydrolysable) tannins than of flavonoids. The complete inhibition observed in this study when pre-incubation was used may be due to the presence of tannins in the extract. However, when AEBd was administered orally according to the traditional method, it was effective in inhibiting edema induced by BaV and enhanced the ability of the antivenom to inhibit edema formation. While the content of total phenolics, total tannins and hydrolysable tannins was greater in *B. dichotoma* extract collected in Manaus, this difference was not reflected in the anti-snakebite potential of the extracts collected in the two locations. Our results indicate that the two extracts have a high antioxidant potential and are not toxic in MRC-5 cells. It is noteworthy that a component in the FBd1 fraction of the aqueous extract blocked 100% of the hemorrhagic activity of BaV when pre-incubated with the venom. Studies to elucidate the chemical structure of this component are currently being carried out by our group.

**Keywords:** Anti-snakebite plants, *Bellucia dichotoma*, *Bothrops atrox*, antivenom, traditional knowledge.

## LISTA DE FIGURAS

Capítulo I	Pg
<b>Figura 1:</b> Frequência dos acidentes ofídicos em Regiões do Brasil no período 2001 a 2012.	27
<b>Figura 2:</b> Serpente <i>Bothrops atrox</i> coletada na Floresta Nacional do Tapajós – FLONA – Km 83, Santarém – PA.....	28
<b>Figura 3:</b> Aspecto geral de <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn.....	31
Capítulo II	
<b>Figura 1:</b> Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> pelo extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i> .....	42
<b>Figura 2:</b> Imagem da pele dos animais no teste de inibição da atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> pelo extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i> e o Soro antibotrópico (SAB), nos diferentes tratamentos.....	43
<b>Figura 3:</b> Inibição da atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> pelo extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i> , em diferentes tratamentos.....	43
<b>Figura 4:</b> Inibição da atividade edematogênica induzida pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i> pelo extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i> , em diferentes tratamentos.....	44
<b>Figura 5:</b> Interação entre extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i> e veneno de <i>Bothrops atrox</i> . A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e B) <i>Western blot</i> .....	45
<b>Figura 6:</b> Zimografia da atividade gelatinolítica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> e do extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i> .....	45
Capítulo III	
<b>Figura 1:</b> Área de coleta dos espécimes de <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn.....	53
<b>Figura 2:</b> Potencial de bloqueio dos extratos aquosos de <i>Bellucia dichotoma</i> frente à atividade fosfolipásica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> .....	62
<b>Figura 3:</b> Potencial de bloqueio dos extratos aquosos de <i>Bellucia dichotoma</i> frente a atividade edematogênica induzida pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i> .....	64
<b>Figura 4:</b> Zimografia da atividade gelatinolítica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> e dos extratos aquosos de <i>Bellucia dichotoma</i> provenientes de Manaus - AM e Santarém – PA.....	65
<b>Figura 5:</b> Interação entre os extratos aquosos de <i>Bellucia dichotoma</i> e veneno de <i>Bothrops atrox</i> . A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e B) <i>Western blot</i> .....	66
<b>Figura 6:</b> Capacidade antioxidante dos extratos aquosos de <i>Bellucia dichotoma</i> pelo método de sequestro do radical livre DPPH.....	67
<b>Figura 7:</b> Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular MRC-5 (fibroblasto humano). Onde: EABd-MAO (Extrato aquoso de <i>B. dichotoma</i> proveniente de Manaus).	68

## Capítulo IV

<b>Figura 1:</b> Perfil cromatográfico do extrato aquoso da casca de <i>Bellucia dichotoma</i> .....	88
<b>Figura 2:</b> Cromatograma do extrato das cascas de <i>Bellucia dichotoma</i> 22% de ACN.....	89
<b>Figura 3:</b> Cromatograma do extrato aquoso das cascas de <i>Bellucia dichotoma</i> (78:22 H <sub>2</sub> O:ACN acidificado com 1% ácido fórmico).....	90
<b>Figura 4:</b> Cromatograma do extrato aquosos das cascas de <i>Bellucia dichotoma</i> (H <sub>2</sub> O:ACN 73:17 acidificado 1% ácido fórmico).....	90
<b>Figura 5:</b> Perfil cromatográfico das frações originadas da Extração em Fase Sólida (SPE)..	91
<b>Figura 6:</b> Cromatograma no modo de eluição isocrático da fração FBd1. Fase móvel H <sub>2</sub> O/ACN 95:5, v/v.....	92
<b>Figura 7:</b> Cromatograma no modo de eluição isocrático da fração FBd1.....	93
<b>Figura 8:</b> Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> pelos compostos isolados do extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i> .....	94
<b>Figura 9:</b> Inibição da atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> pelos compostos isolados de <i>Bellucia dichotoma</i> .....	94
<b>Figura 10:</b> Imagem da pele dos animais no teste de inibição da atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> pelos compostos isolados de <i>Bellucia dichotoma</i> .....	95
<b>Figura 11:</b> Cromatograma da eluição isocrática da fração FBd1. Fase móvel H <sub>2</sub> O/acn 95:5 v/v, acidificado a 1% de ácido fórmico.....	96

## LISTA DE TABELAS

	pg
<b>Capítulo II</b>	
<b>Tabela 1:</b> Concentrações de fenóis totais, taninos totais, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e flavonoides totais do extrato aquoso das cascas de <i>Bellucia dichotoma</i> , obtidos por diferentes metodologias.....	42
<b>Capítulo III</b>	
<b>Tabela 1:</b> Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de <i>Bellucia dichotoma</i> .....	61
<b>Tabela 2:</b> Concentrações de fenóis totais, taninos totais, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e flavonoides totais dos extratos aquosos das cascas de <i>Bellucia dichotoma</i> ...	61
<b>Tabela 3:</b> Potencial de bloqueio dos extratos aquosos de <i>Bellucia dichotoma</i> frente a atividade coagulante induzida pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i> .....	63
<b>Capítulo IV</b>	
<b>Tabela 1:</b> Estimativa de % do solvente B para eluição isocrática, baseada no tempo de retenção da última banda $t_{rz}$ do gradiente inicial.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DMH = Dose mínima hemorrágica

DME = Dose mínima edematogênica

DMC = Dose mínima coagulante

DMHi = Dose mínima hemolítica indireta

DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EABd = Extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*

EABd – MAO = Extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* proveniente de Manaus

EABd - STM = Extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* proveniente de Santarém

EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EROS = Espécies reativas de oxigênio

FUNASA = Fundação Nacional de Saúde

FUNED = Fundação Ezequiel Dias

FIT = Faculdades Integradas do Tapajós

HMS = Hospital Municipal de Santarém

HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)

H<sub>2</sub>O = água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Peróxido de hidrogênio

IVB = Instituto Vital Brasil

IBU = Instituto Butantan

mg = miligrama

mL = mililitro

mm = milímetro

MS = Ministério da Saúde

OMS = Organização Mundial de Saúde

PLA<sub>2</sub> = Fosfolipase A<sub>2</sub>

rpm = Rotações por minuto

s = Segundos

SAB = Soro antibotrópico

SINAN = Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVMP = Metaloproteinasas de zinco dependente (snake venom metalloproteinases)

UFAM = Universidade Federal do Amazonas

UEPA = Universidade do Estado do Pará

UFPA = Universidade Federal do Pará

UFOPA = Universidade Federal do Oeste do Pará

VBa = Veneno de *Bothrops atrox*

°C = graus Celsius

µg = micrograma

µL = microlitro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	20
1.1. Referências bibliográficas.....	22
Capítulo I – (Revisão da literatura) Acidentes Ofídicos na Região Norte do Brasil e o uso de espécies vegetais como tratamento alternativo e complementar à soroterapia).....	24
2. Objetivos.....	37
1.2. Objetivo Geral.....	37
1.3. Objetivos específicos.....	37
Capítulo II (artigo publicado) - <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn. (Melastomataceae): comparação entre os métodos de pré-incubação e de uso tradicional, para avaliar a ação bloqueadora das atividades locais induzidas pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i>	38
Capítulo III (artigo submetido) Potencial de inibição das atividades biológicas do veneno de <i>Bothrops atrox</i> , pelos extratos aquosos de <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn. (Melastomataceae): comparação dos espécimes coletados no Estado do Pará e Amazonas, Manaus .....	49
1. Introdução.....	51
2. Material e Métodos.....	52
2.1. Material vegetal.....	52
2.1.1. Coleta e identificação de <i>Bellucia dichotoma</i> .....	52
2.1.2. Obtenção dos extratos aquosos de <i>Bellucia dichotoma</i> (EABd).....	53
2.1.3. Perfil fitoquímico dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada.....	54
2.1.4. Ensaios colorimétricos.....	54
2.2. Obtenção do veneno de <i>Bothrops atrox</i> (VBa) e do soro antitoxinogênico (SAB).....	55
2.3. Animais.....	55
2.4. Ensaios de bloqueios das atividades induzidas pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i> .....	55
2.5. Citotoxicidade.....	59
2.6. Ensaios de atividade antioxidante.....	59

2.7. Análises estatísticas.....	60
3. Resultados.....	61
3.1. Perfil fitoquímico dos extratos vegetais.....	61
3.2. Ensaio colorimétrico.....	61
3.3. Ensaio de bloqueios das atividades induzidas pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i> .....	62
3.4. Citotoxicidade.....	67
3.5. Ensaio atividade antioxidante .....	67
4. Discussão.....	69
5. Conclusão.....	73
6. Agradecimentos.....	74
7. Referências bibliográficas.....	75
Capítulo IV (artigo em construção) Desenvolvimento de um método por HPLC-DAD para isolamento dos constituintes do extrato de <i>Bellucia dichotoma</i> Cogn. (Melastomataceae): correlação com potencial antiofídico da espécie .....	80
1. Introdução.....	81
2. Material e Métodos.....	82
2.1. Reagentes e materiais.....	82
2.2. Obtenção do veneno de <i>Bothrops atrox</i> (VBa) e soro antiofídico (SAB)	82
2.3. Animais.....	82
2.4. Material vegetal.....	83
2.4.1. Coleta e identificação.....	83
2.4.2. Obtenção do extrato aquoso das cascas de <i>Bellucia dichotoma</i> (EABd).....	83
2.5. Perfil cromatográfico do extrato aquoso.....	83
2.6. Desenvolvimento do método para isolamento.....	84
2.6.1. Extração em fase sólida (SPE).....	84
2.6.2. Instrumentação e condições cromatográficas da análise da fração FBd1.....	84
2.6.3. Isolamento dos constituintes químicos (HPLC- prep).....	85

2.7. Elucidação estrutural das substâncias.....	85
2.8. Avaliação do potencial antiofídicos dos compostos isolados.....	86
2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e <i>Western blot</i> .....	87
2.10. Análises estatísticas.....	88
3. Resultados preliminares.....	88
4. Perspectivas.....	97
5. Referências bibliográficas.....	98
ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO.....	100
TRABALHOS EM ANDAMENTO ORIUNDOS DA TESE.....	101
ANEXOS.....	102

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A incidência de acidentes ofídicos na Amazônia Ocidental brasileira, está entre as mais altas do mundo, e apresenta um problema de saúde ocupacional para as populações rurais (FEITOSA et al., 2015). A maioria destes acidentes ocorre com vítimas da zona rural e estão relacionados com aumento da atividade antrópica e fatores climáticos. As picadas acometem, geralmente, os membros inferiores ou superiores de suas vítimas (PINHO; PEREIRA, 2001). No Brasil, nos últimos dez anos (2003 a 2013), foram notificados cerca de 307.770 acidentes ofídicos, sendo 90% dos casos atribuídos a serpentes do gênero *Bothrops* sp. (BRASIL, 2014).

O envenenamento por serpentes botrópicas desencadeia uma série de ações locais e sistêmicas (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009). O quadro clínico desenvolvido pelo acidentado pode ser muito variado, dependendo da quantidade de veneno inoculado, da localização da picada, da idade e, principalmente, do tempo decorrido após o acidente e o atendimento médico. Na região Norte do Brasil, o problema é agravado devido às longas distâncias existentes entre os locais de ocorrência do acidente e o atendimento médico (BORGES et al., 1999). Dessa forma, os pacientes demoram a receber o tratamento soroterápico específico, o que pode ocasionar no aumento do número de complicações. No Amazonas, por exemplo, quanto ao tempo decorrido entre o acidente até assistência médica, um estudo realizado no período de 2007 a 2012 mostrou que 68,4% dos casos, receberam tratamento dentro das primeiras seis horas após a picada, 13,7% dentro de 6-12 horas e 17,9% com mais de 12 horas após o acidente. Dos casos que evoluíram para morte, 52,7% não receberam antiveno, (FEITOSA et al., 2015). Neste contexto, diversas práticas populares têm sido empregadas nos casos de envenenamentos por serpentes, dentre as quais, a mais utilizada é o uso de plantas medicinais, como coadjuvantes à soroterapia ou como medicamento alternativo aplicado na falta de recursos soroterápicos (MORS et al., 2000; OTERO et al., 2000; CARDOSO, 2009).

Os preparados contra envenenamentos ofídicos possuem as mais diversas misturas, porém, todos têm plantas como constituintes. Um dos mais famosos contravenenos utilizados na região Nordeste é o Específico Pessoa, fabricado em Sobral, no Ceará, elaborado com a raiz de uma planta conhecida como cabeça-de-negro - *Annona coriacea* (CARDOSO, 2009). Na região Norte, um contraveneno bastante utilizado pela população é o Pau-X, produzido por comunitários de Alenquer, no Pará, sendo indicado para envenenamentos de serpentes e escorpiões, cuja composição de plantas é mantida em segredo (CARDOSO, 2009; MOURA;

MOURÃO, 2012). Muitas espécies vegetais da flora brasileira são indicadas ou utilizadas para o tratamento de vítimas de acidentes ofídicos, porém, a maioria não foi estudada cientificamente para verificar suas ações e validar as formas de uso de acordo com a utilização tradicional.

*Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae), é uma árvore nativa da Região Amazônica brasileira, apresenta porte médio, chegando até dez metros de altura. Seus frutos são comestíveis e utilizados na produção de sucos ou doces caseiros (KINUPP E LORENZI, 2014). Suas cascas são bastante utilizadas por populações nativas da região Oeste do Pará, e suas propriedades antiofídicas citadas pelos comunitários foram comprovadas cientificamente por ensaios biológicos utilizando a metodologia de pré-incubação - veneno:extrato (MOURA et al., 2013). Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o extrato aquoso de *B. dichotoma* na inibição das principais atividades biológicas induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops atrox*, analisando seu potencial antiofídico com metodologias de acordo com seu uso tradicional para possível complementação à soroterapia ou a descoberta de novas moléculas que possam ser administradas em quadros hemorrágicos, nas coagulopatias e/ou na inflamação.

A presente Tese de Doutorado foi dividida em:

1. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: Capítulo I- Artigo de Revisão:** Acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil e o uso de espécies vegetais como tratamento alternativo e complementar à soroterapia;
2. **OBJETIVOS:** geral e específicos;
3. **METODOLOGIA e RESULTADOS:** apresentados em forma de artigos, divididos em três capítulos:
  - **Capítulo II-** *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae): comparação entre os métodos de pré-incubação e de uso tradicional para avaliar a ação bloqueadora das atividades locais induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*;
  - **Capítulo III-** Potencial de inibição das atividades biológicas do veneno de *Bothrops atrox*, pelos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae): comparação dos espécimes coletados nos Estados do Pará e Amazonas, Brasil.
  - **Capítulo IV -** Desenvolvimento de um método por HPLC-DAD para isolamento dos constituintes do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae): correlação com potencial antiofídico da espécie

## 1.1 Referências bibliográficas

BORGES, C. C.; SADAHIRO, M.; DOS-SANTOS, M. C. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 637-646, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). **Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000 a 2013**. Brasília, 2014. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-06---CASOS---serpente---2000-a-2013---21-05-2014.pdf> >. Acesso em: 12 maio 2014.

CARDOSO, D. F.; YAMAGUCHI, I. K.; MOURA, A. M. M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 38. p. 419-431.

CARDOSO, J. L. C. A fitoterapia antiveneno na medicina brasileira. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 42. p. 481-485.

FEITOSA, E. L.; SAMPAIO, V. S. ; SALINAS, J. L.; QUEIROZ, A. M.; DA SILVA, I. M.; GOMES, A. A.; SACHETT, J.; SIQUEIRA, A. M.; FERREIRA, L. C. L. ; DOS-SANTOS, M. C.; LACERDA, M.; MONTEIRO, W. Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: a case-control study. **PLoS One**, v. 10 (7), e0132237, 2015.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 6. p. 81-95.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 1 ed. Plantarum, pp. 514-515, 2014.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

MOURA, V. M.; MOURÃO, R. H. V. Aspectos do ofidismo no Brasil e plantas medicinais utilizadas como complemento à soroterapia. **Scientia Amazonia**, v. 1, n. 3, p. 17-26, 2012.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A. F.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, A. M. M.; CHALKIDIS, H. M.; SILVA, M. N.; PACHECO, S.; MOURA, R. H. V. Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 31, p. 2330-2337, 2013.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 233-241, 2000.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

## **CAPÍTULO I**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

**Acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil e o uso de espécies vegetais  
como tratamento alternativo e complementar à soroterapia \***

---

\* Artigo submetido para revista Scientia Amazonia (ISSN 2238.1910) em fevereiro de 2015 e publicado em março de 2015.



## **Acidentes ofídicos na Região Norte do Brasil e o uso de espécies vegetais como tratamento alternativo e complementar à soroterapia<sup>1</sup>**

Valéria Mourão de Moura<sup>2\*</sup>, Rosa Helena Veras Mourão<sup>3</sup>, Maria Cristina Dos-Santos<sup>4</sup>

*Submetido 02/02/2015 – Aceito 08/02/2015 – Publicado on-line 23/03/2015*

### **Resumo**

Na região Amazônica do Brasil a maioria dos acidentes ofídicos é atribuída para a espécie *Bothrops atrox*. O envenenamento por estas serpentes induz reações locais e sistêmicas dependendo da gravidade do acidente. Dentre as reações locais estão presentes: edema, dor, hemorragia, necrose e mionecrose; e nas sistêmicas, principalmente, os distúrbios da coagulação sanguínea e a hemorragia. O único tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde, nos casos de envenenamento por serpentes, é a aplicação de soro antiofídico específico. No entanto, em regiões de difícil acesso a esta terapia, como é o caso da Amazônia, muitas espécies vegetais, da medicina popular, são utilizadas na tentativa de bloquear as atividades biológicas induzidas pelos venenos de serpentes. Algumas dessas espécies vegetais estão sendo estudadas, no intuito de validar o seu uso como antiofídicas. Nesse sentido, essa revisão apresenta o perfil dos acidentes ofídicos no Brasil, com ênfase na Região Norte, e os tratamentos alternativo e complementar à soroterapia convencional com enfoque na espécie vegetal Amazônica *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae).

**Palavras-Chave:** Ofidismo, plantas antiofídicas, medicina popular, doenças negligenciadas.

**Snake bites in northern Brazil and the use of plant species as an alternative and complementary treatment serotherapy.** In the Amazon region of Brazil most snakebites are attributed to *Bothrops atrox* species. The envenomation caused by these snakes induces local and systemic reactions depending on the severity of the accident. Local reactions include swelling, pain, hemorrhage, necrosis and myonecrosis, while the main systemic reactions are blood coagulation and bleeding disorders. The only treatment recommended by the Brazilian Ministry of Health in cases of snakebite envenomation is the application of specific antivenom. However, in areas without easy access to this therapy, such as the Amazon, many plants species from folk medicine are used in an attempt to block the biological activities induced by snake venoms. Some of these plant species are being studied to validate their use for snakebites. This review discusses snakebites in Brazil, with an emphasis on the North of the country, and considers alternative and complementary treatments to conventional serum therapy with particular reference to the Amazon plant species *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae).

**Keywords:** Snakes, plants with anti-snakebite properties, folk medicine, neglected diseases.

<sup>1</sup>Parte da tese de Doutorado do primeiro autor apresentada no Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, Brasil.

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM, Brasil. Email: [mouraovm@yahoo.com.br](mailto:mouraovm@yahoo.com.br).

<sup>3</sup>Professora Adjunta da Universidade Federal do Oeste do Pará – Instituto de Biodiversidade e Floresta, IBEF, Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Campus Tapajós, Santarém - PA, Brasil.

<sup>4</sup>Professora Associada da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, ICB, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.



## 1. Introdução

Os Acidentes Ofídicos são considerados, pela Organização Mundial da Saúde, como sendo uma doença tropical negligenciada. Estima-se que anualmente ocorram cerca de 2.5 milhões de acidentes em todo o mundo, onde 250.000 dos casos evoluem para sérias complicações e 85.000 para mortes (GUTIÉRREZ, 2010). No Brasil, nos últimos 10 anos (2003 a 2013), foram notificados cerca de 307.770 acidentes ofídicos, sendo 90% dos casos atribuídos a serpentes do gênero *Bothrops* sp. (BRASIL, 2014). O envenenamento por serpentes botrópicas desencadeia uma série de ações locais e sistêmicas em suas vítimas (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009).

O quadro clínico desenvolvido pela vítima pode ser muito variado, dependendo da quantidade de veneno inoculado, da localização da picada, da idade e, principalmente, do tempo decorrido após o acidente e o atendimento médico. Na região Norte do Brasil, o problema é agravado devido às longas distâncias existentes entre os locais de ocorrência do acidente e o atendimento médico (BORGES et al., 1999). Dessa forma, os pacientes demoram a receber o tratamento soroterápico específico, o que pode ocasionar no aumento do número de complicações. No Amazonas, por exemplo, 10,5% dos casos evoluem para amputação do membro afetado (BORGES et al., 1999). Neste contexto, diversas práticas populares têm sido empregadas nos casos de envenenamentos por serpentes, dentre as quais, a mais utilizada é o uso de plantas medicinais, como coadjuvantes à soroterapia ou como medicamento alternativo aplicado na falta de recursos soroterápicos (MORS et al., 2000; OTERO et al., 2000; CARDOSO, 2009).

Os preparados contra envenenamentos ofídicos possuem as mais diversas misturas, porém, todos têm plantas como constituintes. Um dos mais famosos contravenenos utilizados na região Nordeste é o Específico Pessoa, fabricado em Sobral, no interior do Ceará, elaborado com a raiz de uma planta conhecida popularmente como cabeça-de-negro (CARDOSO, 2009). Porém, não foi divulgado nome científico e existem, no Brasil, várias espécies com o mesmo nome popular: cabeça-de-negro. Na região Norte, um contraveneno bastante utilizado pela população é o Pau-X, produzido por comunitários de Alenquer, no Pará, sendo indicado para

envenenamentos de serpentes e escorpiões, cuja composição de plantas é mantida em segredo (CARDOSO, 2009; MOURA; MOURÃO, 2012).

Muitas espécies vegetais da flora brasileira são indicadas ou utilizadas para o tratamento de vítimas de acidentes ofídicos, porém, a maioria nunca foi estudada cientificamente para verificar suas ações e validar as formas de uso de acordo com o uso tradicional. Grande parte das plantas é indicada somente pelos seus nomes populares. O problema do reconhecimento das plantas pelos nomes populares é que estes nomes variam de região para região, dificultando ainda mais os estudos científicos.

*Bellucia dichotoma* Cogn. é uma espécie nativa da região Amazônica bastante utilizada por populações ribeirinhas, da região Oeste do Pará, no tratamento de acidentados por serpentes. Essa atividade antiofídica foi comprovada cientificamente por ensaios biológicos utilizando a metodologia de pré-incubação - veneno:extrato (MOURA et al., 2013) e pela metodologia baseada no uso tradicional (MOURA et al., 2014). Sendo assim, esta revisão teve por objetivo descrever a frequência de acidentes ofídicos na região Norte do Brasil, a característica do envenenamento por serpentes do grupo botrópico, bem como, o tratamento convencional utilizado e os métodos tradicionais (plantas medicinais) empregados em caso de envenenamentos por serpentes.

## 2. Metodologia

Para elaboração desta revisão foram utilizadas as palavras-chave: “snake venom”, “anti-snake venom”, “snakebites”, “*Bothrops atrox*”, “Anti-snakebite plants”, “plantas antiofídicas” e “envenenamentos por serpentes”. A pesquisa bibliográfica foi realizada nos seguintes sites de busca, como: Scopus, Scirus, Pubmed, ScienceDirect, Web of Science, SciELO e periódicos Capes. Para pesquisa dos dados atualizados de epidemiologia dos acidentes ofídicos, foi utilizado o Sistema de Informação de Agravos e Notificação – SINAN, disponível no site do Ministério da Saúde do Brasil.

## 3. Revisão bibliográfica

### 3.1. Perfil dos Acidentes Ofídicos no Brasil com ênfase na Região Norte

Acidente ofídico ou Ofidismo é o quadro de envenenamento decorrente da injeção de uma

mistura de toxinas (veneno bruto ou peçonha) através do aparelho inoculador (presas ou dentes) de serpentes. Esses acidentes representam um grave problema de saúde pública e estão inclusos, desde 2009, pela Organização Mundial de Saúde - OMS, na lista de doenças tropicais negligenciadas que acometem, na maioria dos casos populações pobres que vivem em zonas rurais (BRASIL, 2014). De acordo com o Ministério da Saúde, uma média de 26.000 casos é relatada anualmente no Brasil. Na maioria dos casos, principalmente nas regiões onde não ocorre a serpente *Lachesis* sp. (surucucu ou surucucu-pico-de-jaca), o diagnóstico clínico permite a identificação do envenenamento, uma vez que são poucos os pacientes que trazem o animal causador do acidente. Quando há identificação da espécie, o gênero *Bothrops* sp. (jararaca, surucucurana, jararacuçu, dentre outras) aparece como sendo o responsável por aproximadamente 90% dos casos. O gênero *Crotalus* sp. (cascavel) é responsável por 7% dos casos, enquanto os gêneros *Lachesis* sp. (surucucu-pico-de-jaca), *Micrurus* sp. (coral verdadeira) e *Leptomicrurus* sp. (coral verdadeira) são responsáveis por 3% dos casos registrados no Brasil (BRASIL, 2009, 2014).

O perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos, no Brasil, demonstra que 63% das vítimas estão na faixa etária de 20 a 59 anos. A porcentagem de acidentes com crianças e adolescentes está entre 10 e 19 anos e tem variação dependendo da região: Norte (23,2%), Nordeste (21,0%), Sudeste (16,7%), Sul (17,8%) e Centro-Oeste (17,1%). No Brasil, de uma forma geral, 53% das vítimas recebem o tratamento com soro antiofídico em até três horas após o acidente, com exceção para a região Norte, que representa 42% (BOCHNER et al., 2014). As principais vítimas são indivíduos do sexo masculino (geralmente trabalhadores rurais), e a letalidade, nos acidentes, é de 0,45% (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; OLIVEIRA et al., 2009). Os acidentes com serpentes do grupo crotálico (cascavéis) causam uma letalidade de 1,87 %, seguido do laquélico (surucucu - 0,95%), elapídico (corais-verdadeiras - 0,52%) e botrópicos (jararacas - 0,31%) (OLIVEIRA et al., 2009). Apesar do baixo índice de letalidade, há um grande índice de sequelas, consequentes desses acidentes (PINHO; PEREIRA, 2001).

A ocorrência dos acidentes ofídicos está geralmente relacionada a fatores climáticos e ao aumento da atividade humana nos trabalhos de

campo (KOH et al., 2006). Entre 2001 e 2012, foram notificados 329.180 casos de envenenamento ofídico no Brasil. A incidência média nos últimos 12 anos foi em torno de 27 mil casos, o que indicou um aumento médio anual de 4,1% ao ano. Esses números podem ser bem maiores, pois os dados relacionados a mais de 30.000 casos registrados nos períodos de 2009, 2010 e 2011 estavam em tratamento e, os dados de 2012, sujeitos a revisão, além disso, existe a subnotificação (BOCHNER et al., 2014). A maior incidência de casos está na região Norte (7,5%), seguida pelas regiões Centro-Oeste (5,4%), Nordeste (3,8%) e Sudeste (1,9%). A região Sul apresentou a menor média anual de aumento, com 1,1% (Figura 1). Quando observado o período de 2010 especificamente, o maior número de acidentes foi para o Norte (59,4/100.000 habitantes), seguido pelo Centro-Oeste, (22,9/100 mil habitantes) e Nordeste (16,0/100.000 habitantes). Nas regiões Sul e Sudeste, as taxas de incidência foram mantidas abaixo da média nacional (16,0/100 mil habitantes), com 10,1/100.000 habitantes e 8,2/100.000 habitantes, respectivamente. O Estado com o maior número de casos, em 2010, foi o Pará (5.317), enquanto o Tocantins, com a maior taxa de incidência (79,4/100.000), relatou 1.099 casos (BOCHNER et al., 2014; BRASIL, 2014).

Como mencionado anteriormente, na região Norte do Brasil ocorre a maior incidência de acidentes ofídicos do país, num total de 84.963 casos notificados no período de 2001 a 2012, com 439 casos evoluídos para mortes relatados no mesmo período (BOCHNER et al., 2014). Apesar do elevado número de casos, na Amazônia brasileira ainda são poucos os estudos sobre acidentes ofídicos e dados epidemiológicos precisos (NASCIMENTO, 2000; OLIVEIRA; MARTINS, 2001; WALDEZ; VOGT, 2009).

Como mencionado anteriormente, o Pará é o Estado da região Norte onde mais ocorrem acidentes ofídicos, sendo registrados 59.759 casos, no período de 2000 a 2013. O número de óbitos foi de 261, aproximadamente 51,3% dos 508 registros da região, sendo o estado brasileiro com maior mortalidade relacionada aos acidentes ofídicos nesse período de 2000 a 2013 (BRASIL, 2014). O Estado do Amazonas aparece com a segunda maior notificação, sendo registrados 17.745 casos nesse mesmo período (2000 a 2013), com 117 óbitos. No Amazonas, o maior dos estados brasileiros, a mortalidade de 1% associada

aos acidentes ofídicos é mais alta que a média nacional de 0,4% (BORGES et al., 1999; BRASIL, 2001; BOCHNER; STRUCHINER, 2003), embora a taxa real possa ser bem maior devido à subnotificação. Esta subnotificação e o desconhecimento de dados epidemiológicos de pacientes, de diversas localidades do Amazonas, são agravados: pela presença de barreiras geográficas naturais; pelas grandes extensões territoriais dos municípios, dificultando a chegada dos pacientes aos postos de saúde; pela dificuldade de acesso por meios de transportes mais rápidos que os fluviais, dentre outros (PARDAL et al., 1995; BORGES et al., 1999; WALDEZ; VOGT, 2009).

provavelmente, ocorreram em municípios vizinhos, nos quais o atendimento médico, para esse tipo de acidente, é precário.

A maioria dos acidentes ofídicos notificados na região Amazônica é atribuída à espécie *Bothrops atrox*, e apesar do grande número de casos, ainda são poucos os estudos científicos com esta espécie (WALDEZ; VOGT, 2009).

### 3.2. Características da serpente *Bothrops atrox* e ações induzidas pelo veneno

*Bothrops atrox* pertence à família Viperidae é conhecida popularmente como “surucucurana, jararaca-do-rabo-branco ou jararaca do Norte” e está distribuída do Norte da América do Sul ao leste dos Andes, incluindo o Sul e Leste da Venezuela, Sudeste da Colômbia, Leste do Equador, Leste do Peru, Norte da Bolívia, Região Norte do Brasil, em toda a Guiana, Suriname e Guiana Francesa (CAMPBELL et al., 2004). Essa espécie de serpente é caracterizada por possuir a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, denteição do tipo solenóglifa e a presença de fosseta loreal entre o olho e a narina. Não possuem chocalho na cauda e as suas cores variam muito, dependendo da região onde vivem (CAMPBELL et al., 2004; MELGAREJO, 2009). Habitam zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores. Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares (BRASIL, 2001; PINHO; PEREIRA, 2001).

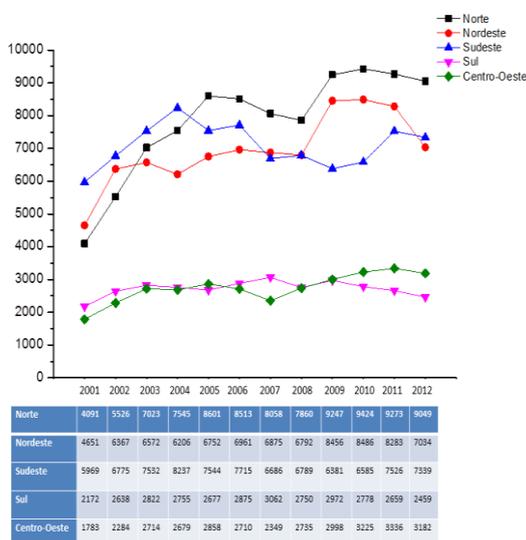


Figura 1 - Frequência dos acidentes ofídicos em Regiões do Brasil no período 2001 a 2012. Fonte: BOCHNER et al. (2014). Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN (BRASIL, 2014).

De todos os municípios do Estado do Pará, Santarém se destaca por apresentar o maior número de notificações de acidentes com animais peçonhentos, com uma média de 1.618 casos por ano, no período de 2007 a 2014, e um índice de ocupação de 20% dos leitos do Hospital Municipal de Santarém (HMS), sendo o gênero *Bothrops* sp. o provável responsável por cerca de 90% desses casos. No Estado do Amazonas, dentre os 62 municípios, foi em Manaus que ocorreu a maior notificação, com 1.363 casos de 2007 a 2014, sendo 80,9% dos acidentes atribuídos, empiricamente, as serpentes do gênero *Bothrops* sp. Esses acidentes atribuídos a Manaus,

*Bothrops atrox* é uma serpente ágil e ativa, que pode superar 1,5 m de comprimento (Figura 2) e que frequenta bastante as beiras dos rios, córregos e igarapés (WARRELL, 2004; CARDOSO, 2009).

Os venenos das serpentes, como as do gênero *Bothrops* sp., compreendem misturas complexas de enzimas tóxicas e proteínas, dentre as quais se destacam as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), metaloproteinases (SVMP) e serinoproteinases (SVSP), que são as mais abundantes (GUTIÉRREZ, 2002; SOARES et al., 2004) e podem ocasionar efeitos locais e sistêmicos em suas vítimas.

Os efeitos locais induzidos pelo envenenamento por serpentes botrópicas

produzem sintomas como dor, edema, hemorragia e necrose. A necrose muscular é uma séria consequência dos acidentes botrópicos, que pode levar a uma perda permanente do tecido e da funcionalidade, requerendo, muitas vezes, a amputação do membro atingido. As alterações locais são desencadeadas muito rapidamente, dificultando a neutralização, principalmente quando o antiveneno é administrado várias horas após o acidente (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009).



Figura 2 - Serpente *Bothrops atrox* coletada na Floresta Nacional do Tapajós – FLONA – Km 83, Santarém-PA. Foto: Hipócrates de Menezes Chalkidis.

Os distúrbios sistêmicos resultam de graves alterações na hemostasia, levando as vítimas de acidentes mais graves a apresentarem prolongamento do tempo de coagulação e sangramento em locais distantes da picada, causando gengivorragia, hematêmese e hematúria. Esses quadros são observados quando grande quantidade de veneno é inoculada, observando-se, também, incoagulabilidade sanguínea, devido ao consumo do fibrinogênio endógeno, por componentes de veneno como a trombina-símiles (KAMIGUTI et al., 1996). Em casos raros, pode ocorrer insuficiência renal aguda e choque. O choque constitui uma evolução rara, porém, de instalação precoce. A sua presença está, provavelmente, relacionada à quantidade de veneno inoculada na vítima (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995).

De modo didático, a fisiopatologia do envenenamento por serpentes botrópicas envolve

uma complexa série de eventos que vai depender da ação de uma das seguintes toxinas: PLA<sub>2</sub>, SVMP e SVSP, ou da combinação desses componentes do veneno (GUTIÉRREZ, 2002).

As PLA<sub>2</sub> constituem a maioria dos componentes tóxicos do veneno e exibe uma variedade de efeitos farmacológicos, por mecanismos que podem ser dependentes ou independentes de sua atividade enzimática, como neurotoxicidade, miotoxicidade, hemólise, anticoagulação, efeitos sobre as plaquetas, indução de edemas e danos teciduais (SOARES; GIGLIO, 2003; KINI, 2005).

As SVMP são toxinas hemorrágicas presentes também nos venenos botrópicos e compartilham um domínio proteásico (metaloproteásico), que contém um átomo de zinco no seu sítio ativo. Estas enzimas, por induzirem hemorragia, são frequentemente chamadas de fatores hemorrágicos ou hemorraginas. As SVMP agem lesando a parede vascular e produzindo hemorragia por dois mecanismos distintos: diretamente sobre proteínas da parede vascular, como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009) e indiretamente, por ação de metaloproteases endógenas, cujos zimogênios seriam ativados pelas SVMP presentes nos venenos de serpentes (BJARNASON; FOX, 1995).

As serinoproteases são importantes para a ação do veneno e algumas são denominadas “trombina-símile”, pois atuam catalisando a conversão direta do fibrinogênio plasmático em fibrina, sem a necessidade da participação da trombina endógena. Estas enzimas, em função da atividade catalítica, agem no sistema de coagulação sanguínea, promovendo alterações na hemostasia, o que pode contribuir para uma hemorragia local e sistêmica. Elas participam da ativação do fator V da cascata de coagulação, na fibrinogênólise, na ativação de plasminogênio e indução de agregação plaquetária (SERRANO; MAROUN, 2005). Além disso, algumas dessas enzimas têm sido utilizadas como agentes anticoagulantes na área médica clínica e cirúrgica e também como reagentes em testes de coagulação (MARSH; WILLIAMS, 2005).

### 3.3. Tratamento convencional: soroterapia

O único tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para os acidentes ofídicos é a administração endovenosa de antiveneno, de



acordo com a gravidade do envenenamento. No Brasil, há quatro centros produtores desses imunobiológicos: Instituto Vital Brazil (IVB, Niterói, RJ), Instituto Butantan (IBU, São Paulo, SP), Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG) e Centro de Produção de Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI, Piraquara, PR). Contudo, estudos demonstram que existem diferenças na capacidade neutralizante dos soros produzidos por estes centros (DA-SILVA et al., 2007).

A produção de soro antitoxinas animais ainda é baseada nos métodos originalmente descritos. Animais de grande porte são imunizados com venenos de uma ou mais espécies de serpentes de importância médica. O soro desses animais contém os anticorpos com capacidade de neutralizar as toxinas do veneno, sendo classificados como monovalente ou polivalente, segundo o número de gêneros de serpentes, cujos venenos foram empregados na imunização (CARDOSO, 2009). Por não ser considerado um animal sagrado, o cavalo continua a ser o animal de escolha para a produção de antiveneno. No entanto, outras espécies animais para imunização têm sido empregadas, com o objetivo de reduzir as reações adversas em pacientes, devido à exposição ao soro de cavalo (WEN, 2009).

No Brasil, são produzidos soros antiofídicos para neutralizar os venenos dos principais gêneros de serpentes causadoras de acidentes: antielapídico (*Micrurus* sp. *Leptomicrurus* sp.), antilaquético (*Lachesis* sp.), anticrotálico (*Crotalus* sp.), antibotrópico (*Bothrops* sp.), antibotrópico-láquetico (*Bothrops* sp. e *Lachesis* sp.) e o antibotrópico-crotálico (*Bothrops* sp. e *Crotalus* sp.). Apesar de a soroterapia reverter com bastante eficácia os efeitos sistêmicos do veneno no organismo da vítima, conseguindo evitar por muitas vezes o óbito, ela apresenta algumas desvantagens, como: uma série de efeitos colaterais (incluindo reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro), ineficiência no combate aos efeitos locais do veneno (aumentando as chances de deixar sequelas no membro atingido e a evolução para complicações raras), e a necessidade de cuidados com a estocagem do soro líquido (não liofilizado) e com o prazo de validade (CARDOSO et al., 2009).

Além disso, existem inconvenientes para essa terapia, como a indisponibilidade do soro para algumas regiões do país, pois os serviços

formais de saúde permanecem restritos às regiões de maior desenvolvimento socioeconômico, onde existem sistemas de atenção médica estruturados. Assim, para as localidades com acentuadas distâncias geográficas e dificuldades de acesso, como o caso da Região Norte, as populações buscam tratamentos alternativos naturais, que possam atuar como uma complementação ou até mesmo como o único recurso na falta do soroterápico específico (BORGES et al., 1999; DOS-SANTOS, 2009).

### **3.4. Tratamento alternativo e complementar à soroterapia tradicional**

A busca por um antídoto seguro contra os venenos de serpentes tem sido longa. Com a distribuição precária e as dificuldades de acesso encontradas, as populações se vêm obrigadas a buscar alternativas terapêuticas para esse tipo de agravo, geralmente buscando o campo da fitoterapia (CARDOSO, 2009). Extratos de plantas medicinais são bastante utilizados em acidentes ofídicos, principalmente por populações de regiões onde o acesso à soroterapia é deficitário ou inexistente. Do conhecimento tradicional surgiram evidências científicas sobre as propriedades antiofídicas destes extratos. Porém, somente na década de 70, do século XX, o tema mereceu devida atenção nos meios científicos (MORS, 1991; MARTZ, 1992).

Neste sentido, várias espécies de plantas antiofídicas têm sido estudadas com o intuito de validar o conhecimento tradicional e caracterizar substâncias biologicamente ativas capazes de inibir diversos efeitos locais e sistêmicos provocados pelos venenos de serpentes. Os extratos vegetais podem conter diversos componentes químicos, como alcaloides, taninos, flavonoides, triterpenos, ligninas, que têm a capacidade de inibir o veneno de serpentes, atuando diretamente como inibidores enzimáticos ou inativadores químicos, os quais interagem diretamente com macromoléculas alvo (MORS et al., 2000).

Um grande número de extratos e seus compostos isolados têm sido testados, demonstrando, pelo menos em estudos *in vitro*, suas capacidades de bloqueio frente às atividades biológicas induzidas pelos venenos de serpentes (MELO et al., 1994; SOARES et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005). O extrato aquoso e frações de *Serjania erecta* foram capazes de bloquear as atividades do veneno e miotoxinas

isoladas de *Bothrops jararacussu* (FERNANDES et al., 2011). O extrato de *Pentaclethra maculosa* e saponinas triterpenoides isoladas, bloquearam as atividades hemorrágica e proteolítica do veneno e de metaloproteínas P-III isoladas de serpentes do gênero *Bothrops* sp. (*B. jararacussu* e *neuwiedii*) (DA SILVA et al., 2007). Diversas espécies vegetais também têm se mostrado eficazes em inibir as atividades do veneno de *Bothrops atrox*, como a *Peltodon radicans* (Lamiaceae), cujos extratos das flores e das folhas inibem a atividade edematogênica (BORGES et al., 1996; COSTA et al., 2008), ou como a *Marsiphanthes chamaedris* (Lamiaceae), conhecida popularmente como *paracari* ou boia-caá ('erva de cobra' em Tupi), cujos extratos de folhas e contusos inibem a atividade inflamatória, edematogênica e coagulante do veneno de *B. atrox* (MAGALHÃES et al., 2011).

Inúmeros são os trabalhos nos quais são atribuídos aos vegetais atividades de antiveneno, mas estudos bem conduzidos, que fundamentem essas indicações, são extremamente escassos na literatura (VILAR et al., 2005; CARDOSO, 2009). De um modo geral, com raras exceções, a fitoterapia antiveneno no nosso meio científico está baseada em dados que superestimam a capacidade antiofídica dos extratos vegetais, havendo necessidade de uma avaliação crítica de sua real eficácia, utilizando protocolos que simulem o uso tradicional, o que se torna extremamente importante quando se pensa na produção de um fitoterápico que possa ser utilizado como um coadjuvante à soroterapia convencional (MOURA et al., 2014).

Dentre os fitoterápicos indicados como antiveneno no Brasil, atualmente disponíveis no comércio, e que são utilizados sem embasamento científico, os mais encontrados são, como mencionado anteriormente: Específico Pessoa, Pau-X, Específico composto P. Esser e Kutelak. O específico Pessoa é amplamente comercializado nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste e as populações locais atribuem a essa tintura alto poder curativo. No entanto, Borges et al., (1996), em estudos desenvolvidos verificaram que o Específico Pessoa era destituído de ação terapêutica *in vivo*, chegando a sugerir a interdição da comercialização do produto. O Pau-X é bastante utilizado na região Oeste do Pará, porém não existem trabalhos científicos que comprovem sua eficácia. O Específico composto P. Esser, fabricado em Santa Catarina, sob forma

de tintura composta por três extratos vegetais (jaborandi, pipi e caçau). O Kutelak, comercializado no litoral norte do Estado de São Paulo, é uma tintura vegetal que tem por base a *Bauhinia* sp., conhecida popularmente como *pata de vaca*. Tanto para o Específico composto P. Esser como para o Kutelak, não foram encontradas referências que comprovem suas eficácias.

Na região Oeste do Pará, além da utilização do contraveneno Pau-X, as plantas medicinais são usadas com bastante frequência no caso de envenenamento por serpentes. Em um levantamento etnobotânico realizado em comunidades de Santarém, PA, foram citadas 24 espécies de plantas de uso antiofídico, sendo que 12 espécies foram testadas contra o veneno de *Bothrops jararaca* e capazes de reduzir, em diferentes percentagens, a atividade hemorrágica induzida pelo veneno (MOURA et al., 2015). Cinco espécies vegetais foram capazes de inibir 100% a atividade hemorrágica, utilizando-se protocolo de pré-incubação (veneno:extrato). Quando testadas às atividades edematogênica, hemorrágica, fosfolipásica A<sub>2</sub> e coagulante, induzidas pelo veneno de *B. atrox*, três espécies vegetais (*Bellucia dichotoma*, *Plathymentha reticulata* e *Connarus favosus*) bloquearam 100% tais atividades (MOURA et al., 2013). No entanto, o protocolo de pré-incubação utilizado nesses estudos pode superestimar a ação bloqueadora dos extratos, sendo necessários trabalhos que avaliem a capacidade de bloqueio do extrato sem pré-incubação com o veneno, e por vias de administração independentes (extrato por via oral ou conforme o uso popular; e o veneno por via subcutânea, intramuscular ou endovenosa, de acordo com a atividade testada).

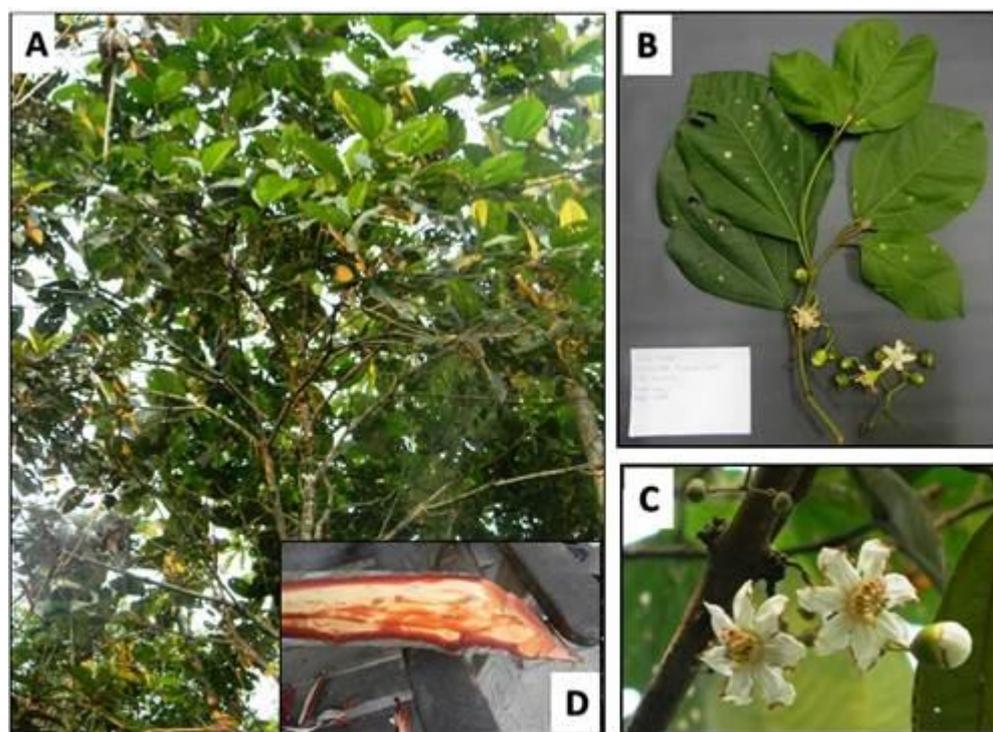
### 3.5. *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae)

*Bellucia dichotoma* pertence à família Melastomataceae (Figura 3), que é constituída por aproximadamente 4.570 espécies, pertencentes a 166 gêneros, com distribuição pantropical com cerca de 3.000 espécies no neotrópico (CLAUSING; RENNER, 2001). No Brasil, ocorrem 68 gêneros e mais de 1.500 espécies (ROMERO; MARTINS, 2002). Atualmente, são conhecidas cerca de 2.950 espécies, sendo a sexta maior família de Angiospermas, que se distribuem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, estando presente em praticamente todos os tipos

de vegetação, com um número variável de espécies (RENNER, 1994).

Do gênero *Bellucia* sp., são poucos os trabalhos relacionados com estudos fitoquímicos. Apenas as espécies *Bellucia grossularioides* e *Bellucia pentamera* já possuem algum estudo fitoquímico. ISAZA et al. (2007) concluíram que, embora *B. grossularioides* e *B. pentamera* pertençam ao mesmo gênero, elas apresentaram diferenças consideráveis quanto à composição

química, de maneira que a espécie *B. grossularioides* é rica em compostos de média polaridade, enquanto a espécie *B. pentamera* apresenta como composto majoritário o esqualeno. Para a espécie *B. dichotoma*, apenas MOURA et al. (2013) relatam as principais classes de metabólitos desta espécie, onde foram detectados ácidos graxos, flavonoides, terpenos, taninos hidrolisáveis e condensados no extrato aquoso da casca.



**Figura 3** - Aspecto geral de *Bellucia dichotoma* Cogn. A) Árvore; B) Folhas; C) Flores; D) Casca. Foto: Valéria Mourão.

*Bellucia dichotoma* é uma espécie endêmica da região Amazônica, conhecida popularmente como *muúba* ou *goiaba-de-anta* (Figura 3). Suas cascas são utilizadas com fins medicinais em Santarém-PA (FORERO-PINTO, 1980), principalmente para tratar envenenamentos ofídicos (MOURA et al., 2013). O potencial de bloqueio do extrato aquoso da casca de *B. dichotoma* foi testado contra os efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca* (hemorrágica) e *Bothrops atrox* (hemorrágica, fosfolipásica, edematogênica e coagulante), o qual apresentou 100% de inibição frente às atividades mencionadas (MOURA et al., 2013, Moura et al., 2015). No entanto, quando testada pela primeira vez em protocolos que simulavam uso tradicional, ou seja, extrato aquoso por via oral, foi capaz de reduzir o edema significativamente a partir dos 30 minutos em todas as doses avaliadas. A inibição máxima ocorreu na 6ª hora de tratamento e foi ainda maior, quando o extrato (via oral) e soro antibotrópico

foram administrados concomitantemente, sendo este tratamento mais eficaz do que o preconizado, pelo Ministério da Saúde, somente com o antiveneno padrão (MOURA et al., 2014). Tais fatos fazem dessa espécie um alvo promissor, no sentido de realizar estudos que avaliem a capacidade do extrato em bloquear as principais atividades locais do veneno de *Bothrops atrox*, e realizar estudos de caracterização química dos compostos presentes no extrato aquoso. Os resultados alcançados poderão servir como base para a conservação e aproveitamento de espécies vegetais antiofídicas nativas, produção de fitoterápicos e busca de novas drogas, visando aprimorar o tratamento de acidentados por serpentes e, também, agregar valor ao conhecimento popular.

#### 4. Conclusão

Nesta revisão foram abordados os seguintes temas: a problemática dos acidentados



ofídicos no Brasil com enfoque para Região Norte, as características da principal espécie causadora dos acidentes, bem como o tratamento alternativo utilizado por populações que sofrem com o difícil acesso a soroterapia convencional. Os trabalhos que verificam a ação antiofídica de extratos vegetais são crescentes, porém a maioria ainda utiliza metodologia de pré-incubação veneno:extrato, o que superestima os resultados, demonstrando a necessidade de estudos que validem a atividade antiofídica desses extratos vegetais por experimentos que simulem o uso popular.

### Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Produtividade (No. 303786/2013-2) à Maria Cristina dos Santos e da bolsa de Doutorado concedida à Valéria Mourão de Moura (No. 151279/2012-8).

### Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista Scientia Amazonia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

### Referências

- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 345-368, 1995.
- BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; MACHADO, C. A Profile of Snake Bites in Brazil, 2001 to 2012. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 4, n. 3, p. 1-7, 2014.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7-16, 2003.
- BORGES, C. C.; SADAHIRO, M.; DOS-SANTOS, M. C. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 637-646, 1999.
- BORGES, C.C.; CAVALCANTI-NETO, A.J.; BOECHAT, A.L.; FRANCISCO, C.H.; ARRUDA,

M.R.E.; DOS-SANTOS, M.C. Eficácia da espécie vegetal *Peltodon radicans* (Labiatae, Lameaceae) na neutralização da atividade edematogênica e ineficácia do extrato vegetal Específico Pessoa na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops atrox*. **Revista da Universidade do Amazonas, 1. Ciências Biológicas, Série**, pp. 97-113, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). **Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000 a 2013**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-06---CASOS---serpente---2000-a-2013---21-05-2014.pdf>>. Acesso em: 12 mai 2014.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.; BRODIE, E. D. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. 1. ed. New York: Comstock Publishing Associates Ithaca, 2004. v. 1. 1032 p.

CARDOSO, D. F.; YAMAGUCHI, I. K.; MOURA, A. M. M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 38. p. 419-431.

CARDOSO, J. L. C. A fitoterapia antiveneno na medicina brasileira. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 42. p. 481-485.

CLAUSING, G.; RENNER, S. S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 486-498, 2001.



COSTA, H. N. R.; DOS-SANTOS, M. C.; ALCÂNTARA, A. F. C.; SILVA, M. C.; FRANÇA, R. C.; PILÓ-VELOSO, D. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 31, p. 744-750, 2008.

COSTA, T. R. **Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico**. Ribeirão Preto, São Paulo. 2010. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

DA-SILVA, J. O.; FERNANDES, R. S.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, C. Z.; MAZZI, M. V.; FRANCO, J. J.; GIULIATTI, S.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 283-291, 2007.

DOS-SANTOS, M.C. Serpentes peçonhentas e ofidismo no Amazonas. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 11. p. 132-142.

FERNANDES, R. S.; COSTA, T. R.; MARCUSSI, S.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; RODRIGUÉZ, G. I.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2011.

FORERO-PINTO, L. E. Etnobotânica de las comunidades indígenas Kuna y Waunana, Chocó (Colombia). **Cespedesia**, v. 9, n. 33-34, p. 115-301, 1980.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 6. p. 81-95.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Revista de Biología Tropical**, v. 50, p. 377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico em América Latina. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 33. p. 352-375.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J.M., THEAKSTON, R.D., WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. 0727-0731, 2010.

ISAZA, M.; HIPÓLITO, J.; OROZCO, L. M.; RIVERA, D. A.; TAPIAS, L. J.; RAMÍREZ, A.; STELLA, L.; VELOZA, C.; ANGELA, L.; ZULETA, L. M. Perfis cromatográficos preliminares por GC-MS de algunas especies de plantas melastomatáceas. **Scientia et Technica**, n. 33, 2007.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, n. 6, p. 627-642, 1996.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1147-1161, 2005.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.

MAGALHÃES, A.; SANTOS, G. B.; VERDAM, M. C. D. S.; FRAPORTI, L.; MALHEIRO, A.; LIMA, E. S.; DOS-SANTOS, M. C. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 1, p. 82-88, 2011.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1171-1181, 2005.



MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1131-1142, 1992.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 4. p. 42-70.

MELO, P. A.; NASCIMENTO, M. C.; MORS, W. B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, v. 32, n. 5, p. 595-603, 1994.

MORS, W. B. Plants against snake-bites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 193, 1991.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

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. 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**, v. 85, n. 0, p. 59-68, 2014.

MOURA, V. M.; MOURÃO, R. H. V. Aspectos do ofidismo no Brasil e plantas medicinais utilizadas como complemento à soroterapia. **Scientia Amazonia**, v. 1, n. 3, p. 17-26, 2012.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A. F.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, A. M. M.; CHALKIDIS, H. M.; SILVA, M. N.; PACHECO, S.; MOURA, R. H. V. Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 31, p. 2330-2337, 2013.

MOURA, V.M.; SOUSA, L. A. F.; DOS-SANTOS, M. C.; RAPOSO, J. D. A.; LIMA, A.E.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, M. N.; MOURÃO, R. H. V. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 224-232, 2015.

NASCIMENTO, S. P. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos no Estado de Roraima, Brasil, entre 1992 e 1998. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 271-276, 2000.

OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 213-216, 2005.

OLIVEIRA, M. E.; MARTINS, M. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 8, n. 2, p. 101-110, 2001.

OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. H.; SIFUENTES, D. H. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 2. p. 6-21.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SILDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 233-241, 2000.

PARDAL, P. P. O.; MONTEIRO, M. R. C. C.; ARNAUND, R. N.; LOPES, F. O. B.; ASANO, M. E. Aspectos epidemiológicos de 465 acidentes ofídicos atendidos no HUIBB - Belém-Pará no período de 1993 a 1994. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. supl. I, p. 170, 1995.

PARDAL, P. P. O.; SOUZA, S. M.; MONTEIRO, M. R. C. C.; WEN, F. H.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; TOMY, S. C.; SANO-MARTINS, I. S.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; COLOMBINI, M.; KODERA, N. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; VELARDE, D. T.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 28-42, 2004.



PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

RENNER, S. S. A revision of Pterolepis (Melastomataceae: Melastomeae). **Nordic Journal of Botany**, v. 14, n. 1, p. 73-104, 1994.

ROMERO, R.; MARTINS, A. B. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 25, n. 1, p. 19-24, 2002.

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.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

SOARES, A. M.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs of the Future**, v. 29, n. 11, p. 1105-1117, 2004.

VILAR, J. C.; CARVALHO, C. M.; FURTADO, M. F. D. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas. **Biologia Geral e Experimental**, v. 6, n. 1, p. 1-36, 2005.

WALDEZ, F.; VOGT, R. C. Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 681-696, 2009.

WARRELL, D. A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.; BRODIE, E. D. (Org.). **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. 1. ed. New York: Comstock Publishing Associates Ithaca, 2004. p. 1032.

WEN, F. H. Soroterapia. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 42. p. 432-445.

## 2. OBJETIVOS DA TESE

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar os extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* Cogn. na inibição das principais atividades biológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*, analisando seus potenciais antifídicos para possível complementação à soroterapia ou a descoberta de novas moléculas que possam ser administradas em quadros hemorrágicos, nas coagulopatias ou na inflamação.

### 2.2. Objetivos específicos

- 1) Verificar o potencial antifídico de *B. dichotoma* usando, além da pré-incubação as metodologias tradicionais: pré-tratamento, pós-tratamento e o efeito em combinação com o antibotrópico, frente às principais atividades locais induzidas pelo veneno de *B. atrox* – **Capítulo II**;
- 2) Comparar os efeitos bloqueadores dos extratos aquosos de *B. dichotoma*, coletadas de espécimes oriundas de Manaus-AM e de Santarém-PA, frente às seguintes atividades biológicas induzidas pelo veneno de *B. atrox*: fosfolipásica A<sub>2</sub>, coagulante e edematogênica – **Capítulo III**;
- 3) Desenvolver um método para isolamento dos compostos majoritários presentes no extrato aquoso de *B. dichotoma* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) – **Capítulo IV**.

## CAPÍTULO II

### ***Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae): comparação entre os métodos de pré-incubação e de uso tradicional, para avaliar a ação bloqueadora das atividades locais induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*<sup>1†</sup>**

Valéria Mourão de Moura<sup>a,b,\*</sup>; Adrielle N. Serra Bezerra<sup>c</sup>, Rosa Helena Veras Mourão<sup>c</sup>, Juliana L. Varjão Lameiras<sup>a,b</sup>; Juliana D. Almeida Raposo<sup>c</sup>; Rafael Luckwu de Sousa<sup>b</sup>; Antônio Luiz Boechat<sup>b</sup>; Hipócrates de Menezes Chalkidis<sup>d</sup>; Maria Cristina Dos-Santos<sup>a,b,\*</sup>

Este trabalho apresenta o potencial antiofídico do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* Cogn. elaborado de acordo com uso tradicional. Muitos estudos têm demonstrado a ação positiva de extratos vegetais em bloquear atividades induzidas por venenos de serpentes, porém a maioria foi realizada somente com pré-incubação, que é a mistura de veneno mais extratos. Neste trabalho, comparamos a ação do extrato aquoso de *B. dichotoma* em bloquear atividades do veneno de *B. atrox* por diferentes protocolos experimentais. Além da (1) pré-incubação (veneno:extrato), utilizamos os seguintes tratamentos: (2) Pré-tratamento (extrato via oral); (3) Pós-tratamento (extrato via oral) e (4) Extrato em combinação com o soro antibotrópico. Todos os experimentos foram realizados com as doses do extrato baseadas no uso popular.

Além de verificar a ação do extrato sobre o veneno de *B. atrox*, por eletroforese em SDS-PAGE, Zimografia e *Western-blot*.

---

<sup>1</sup>Este trabalho foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental - LABBEx da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA. Foi submetido à revista *Toxicon* (ISSN 0041-0101) em fevereiro de 2014 e aceito para publicação em abril de 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<sup>☆</sup>



Valéria Mourão de Moura<sup>a,b,\*</sup>, Adrielle N. Serra Bezerra<sup>c</sup>, Rosa Helena Veras Mourão<sup>c</sup>, Juliana L. Varjão Lameiras<sup>a,b</sup>, Juliana D. Almeida Raposo<sup>c</sup>, Rafael Luckwu de Sousa<sup>b</sup>, Antônio Luiz Boechat<sup>b</sup>, Ricardo Bezerra de Oliveira<sup>c</sup>, Hipócrates de Menezes Chalkidis<sup>d</sup>, Maria Cristina Dos-Santos<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM 69077-000, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM 69077-000, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia and Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA 68035-110, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Pesquisas Zoológicas, Faculdades Integradas do Tapajós, Santarém, PA 68010-200, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 February 2014

Received in revised form 20 April 2014

Accepted 29 April 2014

Available online 9 May 2014

#### Keywords:

*Bellucia dichotoma*

*Bothrops atrox*

Snake-bite accidents

Anti-snake bite plants

### ABSTRACT

*Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) is one of various plant species used in folk medicine in the west of the state of Pará, Brazil, to treat snake bites. Many studies have been carried out to evaluate the effectiveness of anti-snake bite plants, but few of these use the same preparation methods and doses as those traditionally used by the local populations. This study therefore compared inhibition of the main local effects of *B. atrox* venom (BaV) by aqueous extract of *B. dichotoma* (AEBd) administered according to traditional methods and pre-incubated with BaV. The concentrations of phenolic compounds (tannins and flavonoids) in AEBd were determined by colorimetric assays. The effectiveness of AEBd in inhibiting the hemorrhagic and edematogenic activities of BaV was evaluated in mice in four different experimental *in vivo* protocols: (1) pre-incubation (venom:extract, w/w); (2) pre-treatment (p.o.); (3) post-treatment (p.o.); and (4) AEBd (p.o.) in combination with *Bothrops* antivenom (BA) (i.v.). To assess *in vitro* inhibition of BaV phospholipase A<sub>2</sub> activity, the pre-incubation method or incorporation of AEBd or BA in agarose gels were used. The effect of AEBd on BaV was determined by SDS-PAGE, zymography and Western blot. Colorimetric assays revealed higher concentrations of (condensed and hydrolyzable) tannins than flavonoids in AEBd. Hemorrhagic activity was completely inhibited using the pre-incubation protocol. However, with pre-treatment there was no significant inhibition for the concentrations tested, and with the post-treatment only the 725 mg/kg dose of AEBd was able to inhibit 40.5% ( $p = 0.001$ ) of the hemorrhagic activity of BaV. Phospholipase A<sub>2</sub> activity was only inhibited when AEBd was pre-incubated with BaV. BaV-induced edema was completely inhibited with pre-

<sup>☆</sup> This article has been written as part of VMM's doctoral thesis.

\* Corresponding author. Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Octávio Jordão Ramos, 3000, Japiim CEP 69057-000, Brazil. Tel.: +55 (0) 9281641596.

E-mail addresses: [mouraovm@yahoo.com.br](mailto:mouraovm@yahoo.com.br), [valerivras@hotmail.com](mailto:valerivras@hotmail.com) (V. Mourão de Moura).

incubation ( $p < 0.05$ ) and significantly reduced ( $p < 0.05$ ) with pre- and post-treatment (p.o.) for the concentrations tested. The reduction in local edema was even greater when AEBd was administered in combination with BA. The SDS-PAGE profiles showed that several of the BaV protein (SDS-PAGE) and enzyme (zymography) bands were not detected when the venom was pre-incubated, and Western blot revealed that this was not caused by the AEBd enzymes observed in the zymogram. The “pseudo inhibition” observed after pre-incubation in this study may be due to the presence of tannins in the extract, which could act as chelating agents, removing metalloproteins and  $\text{Ca}^{2+}$  ions and thus inhibiting hemorrhagin and  $\text{PLA}_2$  activity. However, when administered according to traditional methods, *B. dichotoma* extract was effective in blocking BaV-induced edematogenic activity and had an additional effect on inhibition of this activity by BA.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Snake-bite accidents are considered a serious public-health problem not only because of the frequency with which they occur but also because of the intensity of the effects of the venom on their victims (Bochner and Struchiner, 2003). Although no worldwide epidemiologic study has been undertaken, the World Health Organization (WHO) considers snake bites to be a neglected tropical disease that leads to irreversible sequelae and mortality and affects thousands of individuals every year (WHO, 2007, 2009). In Brazil, most snake bites are caused by snakes from the genus *Bothrops* (Ministério da Saúde do Brasil, 2010, 2010), whose venom induces systemic and local effects, including extensive hemorrhaging, myonecrosis, edema, abnormal blood clotting, kidney failure, blistering and necrosis, and can lead to loss of the affected limb (Warrell, 2004; Gutiérrez et al., 2010).

*Bothrops atrox* is the most common venomous snake in the Brazilian Amazon region. It is popularly known as the *jararaca do norte*, *surucucurana* or *jararaca do rabo branco* and is considered the main cause of snake bites in this region (Cardoso et al., 2009). The only treatment recommended by the Brazilian Ministry of Health for these snake bites is *Bothrops* antivenom, which is quite effective in reverting the systemic effects but does not fully neutralize the local damage (Cardoso et al., 1993; Da Silva et al., 2003, Ministério da Saúde do Brasil, 2013). The situation is complicated further when the accident happens in a remote, inaccessible region where the recommended treatment is not readily available (Borges et al., 1999), making the development of synthetic or natural medicines that can be used in combination with serum therapy very important (Cardoso et al., 2003).

Brazilian folk medicine provides ample descriptions of the use of plants to combat a variety of diseases, including envenomation by poisonous snakes. In the Amazon region, for example, the local population uses *Pentaclethra macroloba* macerate as a poultice in the area of the bite (Da Silva et al., 2005; Da Silva et al., 2007). Other plants, such as *Peltodon radicans* (Borges et al., 1996; Costa et al., 2008) and *Marsypianthes chamaedrys* (Magalhães et al., 2011), both known as *paracari*, are macerated and the juice drunk after the individual has been bitten. However, a very large number of species are used to treat envenomation due to snake bite without any scientific validation.

In the last twenty years many studies on the effectiveness of plants in the treatment of envenomation by snakes of genus *Bothrops* have been published. A short search of *Scopus* and *ScienceDirect* revealed sixteen articles on this subject. Of these, twelve used the pre-incubation technique (Borges et al., 2000; Borges et al., 2001 Cavalcante et al., 2007; Izidoro et al., 2003; Da Silva et al., 2005; Maiorano et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Ticli et al., 2005; Da Silva et al., 2007; Estrada et al., 2010; Fernandes et al., 2011; Patiño et al., 2013) and four the pre-incubation and post-treatment techniques (Veronese et al., 2005; Magalhães et al., 2011; Mendes et al., 2013; Strauch et al., 2013). This shows that most studies use the pre-incubation method only and therefore may overestimate the effectiveness of extracts considered to have anti-snake bite properties.

*Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) which is popularly known as *muúba* or *goiaba de anta* (tapir guava) is a native plant to the Amazon region and is found in four states in the north of Brazil: Acre, Amazonas, Amapá and Pará (Baumgratz, 2013). Its bark is used in folk medicine in the form of a tea (decoction) to treat snake bites in communities in the west of the state of Pará (Moura et al., 2013). In an earlier study, we found that pre-incubated aqueous extract of *B. dichotoma* inhibited some of the local effects induced by *B. atrox*, such as hemorrhaging and edema (Moura et al., 2013). In light of this, the present study sought to investigate the potential of *B. dichotoma* to inhibit the main local activities induced by *B. atrox* venom (BaV) using pre-incubated extract and extract administered according to the methods used by these communities, i.e., pre-treatment, post-treatment and the extract combined with *Bothrops* antivenom (BA).

## 2. Materials and methods

### 2.1. *Bothrops atrox* venom and *Bothrops antivenom*

The venom was extracted from adult *B. atrox* specimens from the Tapajós National Forest, FLONA, which is located at km 83 on the BR-163 highway in Santarém, PA, Brazil. Approval to collect the snakes and extract venom was obtained on Sisbio, the Biodiversity Authorization and Information System (ref. no. 14018-8). The specimens were kept at the Faculdades Integradas do Tapajós (FIT) breeding colony under CONCEA authorization number 26/2013. The venom collected from the snakes was lyophilized at the

Bioprospecting and Experimental Biology Laboratory, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém, PA, Brazil, and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The *Bothrops* antivenom used was produced by the Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil, from plasma of horses that had been immunized with a mixture of the following venoms: *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops neuwiedi* (12,5%), *B. alternatus* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) and *B. jararacuçu* (12,5%). The batch number was 105113B.

## 2.2. Animals

Male Swiss mice weighing between 34 and 41 g were obtained from the UFOPA breeding colony and kept at a temperature of  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$  in a 12 h/12 h light/dark cycle in standard cages with ad libitum food and water. All the experiments were carried out in accordance with the guidelines in federal law no. 11.794, dated October 8th, 2008, which specifies the procedures for the use of animals for scientific purposes, and with the approval of the Universidade do Estado do Pará (UEPA) Animal Ethics Committee, under reference no. 43/11.

## 2.3. Plant material

### 2.3.1. Collection and identification

Samples of the bark of *Bellucia dichotoma* were collected in the savannah close to the Cucurunã community ( $02^{\circ}27'21.0''\text{S}$  and  $54^{\circ}47'45.7''\text{W}$ ) Santarém, Pará, Brazil. A dried specimen of the species was deposited in the EMBRAPA/Eastern Amazon Region herbarium (Belém, PA, Brazil) under IAN virtual herbarium code 1852213.

### 2.3.2. Preparation of the aqueous extract of *B. dichotoma* bark (AEBd)

The aqueous extract was prepared according to traditional methods used by the local communities in the Eixo-Forte region of western Pará, in the Amazon region of Brazil. Fifty grams of powder from *B. dichotoma* bark was extracted with distilled water in the ratio 1:10 (w/v) under constant agitation at 1250 rpm and  $100^{\circ}\text{C}$  until it boiled (tea decoction). After cooling, 150 mL was removed (i.e., the equivalent of a teacup, or the amount used by an adult). This was then lyophilized and the final dry weight of the extract was 2.9 g. The amount administered was calculated according to each animal's weight based on the dose of 2.9 g/60 kg used in folk medicine. A weight of 60 kg was used to calculate the dosage based on the assumption that this is the average weight of an adult in this region of Brazil. As the local population drinks a glass of tea made from *B. dichotoma* three times a day before going into wooded areas, doses of 48.3, 145 and 283.3 mg/kg were used, i.e., the single dose used by the population (48.3 mg/kg), three times this dose (145 mg/kg) and six times this dose (283.3 mg/kg).

### 2.3.3. Colorimetric assays

Total phenol content in the lyophilized AEBd was determined as described elsewhere (Mole and Waterman, 1987a,b) using a Quimis Q 108U2VL spectrophotometer at 510 nm and  $\text{FeCl}_3$  (Vetec) chromogenic agent. Tannic acid

(Sigma) was used at concentrations ranging from 0.05 to 0.8 mg/mL ( $R = 0.99$ ) to prepare a standard curve. Total tannin content was measured by the Hagerman and Butler method (Mole and Waterman, 1987a) after precipitation with bovine serum albumin (BSA, Sigma) in sodium acetate buffer, pH 4.9, and  $\text{FeCl}_3$  was used to develop the color. Absorbance was read at 510 nm using a standard curve prepared with tannic acid (0.2–0.8 mg/mL,  $R = 0.99$ ). The concentration of hydrolyzable tannins was determined by complexing them with potassium iodate (Vetec) as described by Willis and Allen (1998). Absorbance was read at 550 nm, and tannic acid was used for the standard curve (0.05–0.6 mg/mL,  $R = 0.99$ ). The concentration of condensed tannins was determined following the method described by Sun et al. (1998) using vanillin (Vetec) in an acid medium to develop the color. Hydrated catechin (Sigma) was used for the standard curve (0.1–1.0 mg/mL,  $R = 0.99$ ), and absorbance was read at 500 nm. Total flavonoid concentration was measured by complexing with  $\text{AlCl}_3$  (Vetec), as described by Chabariberi et al. (2009). Hydrated rutin (Sigma) was used for the standard curve (5–50 mg/mL,  $R = 0.99$ ), and absorbance was read at 500 nm. All colorimetric assays were performed in triplicate.

## 2.4. Phospholipase activity

Phospholipase  $A_2$  activity was measured based on its indirect hemolytic action on agarose gel, using egg yolk and red blood cells as substrate. The minimum indirect hemolytic dose (MiHD) was defined by Gutierrez et al. (1988) as being the amount of venom that could produce a hemolytic halo 10 mm in diameter. The ability of AEBd to inhibit phospholipase activity was evaluated in three different protocols: 1) pre-incubation of AEBd with two MiHD of BaV (1:10, 1:20, 1:30 w/w) and controls with BaV + PBS or BaV + BA; 2) AEBd or BA were incorporated into the gel using the same proportions as for pre-incubation; 3) AEBd was incorporated into the gel in concentrations based on those used in folk medicine (48.3, 145 and 283.3 mg/kg). Enzyme activity was expressed as a percentage inhibition, where 100% inhibition corresponded to the absence of a hemolytic halo. Each assay was performed in triplicate and expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the mean.

## 2.5. Protocols used in the tests to assess in vivo inhibition of hemorrhagic and edematogenic activities

The protocols used in our study were designed to simulate the use of this extract in folk medicine: 1 – pre-treatment (one hour before venom was injected), as the population uses the extract as a prophylactic by taking a 150 mL glass of tea before going into wooded areas (the extract is generally used sporadically rather than regularly by small farmers) 2 – post-treatment (one hour after the venom was injected); 3 – combination therapy (plant extract administered orally and *Bothrops* antivenom administered i.v.) as in most cases the population takes the tea first and receives the specific antivenom later; 4 – pre-incubation (to show that pre-incubation overestimates the effectiveness of plants considered to have anti-snake bite properties).

### 2.5.1. Hemorrhagic activity

BaV-induced hemorrhage was assessed following [Kondo et al. \(1960\)](#) with some modifications. Minimum hemorrhagic dose (MHD) was defined as the smallest amount of venom that could induce a 10 mm-diameter hemorrhagic lesion in mice. To determine the MHD, 50  $\mu$ L of solutions containing different concentrations of BaV were injected intradermally (i.d.) into the dorsal region of the mice. The negative control received 50  $\mu$ L of saline solution. Three different protocols were used to determine the inhibitory effect of AEBd on the hemorrhagic activity of BaV: 1) pre-incubation – animals were injected i.d. with AEBd pre-incubated with BaV at 37 °C for 30 min (1:5 and 1:10 w/w); 2) pre-treatment – 48.3, 145 or 283.3 mg/kg of AEBd (p.o.) or BA were administered (i.v.) 1 h before injection of BaV (2MHD); and 3) post-treatment – 48.3 or 145 mg/kg of AEBd (p.o.) or BA (i.v.) were administered immediately after injection of BaV (2MHD). Control groups with BaV + BA or BaV + saline were used in all the experiments; saline or water was used depending on the treatment (i.d. or p.o., respectively). Four animals were used for each treatment and dose combination.

One hour after the injection the animals were sacrificed, the dorsal tissues were removed and photographed and the images were digitalized, saved as RGB files and processed following [Dougherty \(2002\)](#) using a Matlab script ([Gonzalez et al., 2009](#)). Image components were selected with a threshold device ([Guerra et al., 2011](#)), and a morphological image processor was used to obtain the haloes. The area (mm) and greatest diameter were measured following [Dougherty and Lotufo \(2003\)](#).

### 2.5.2. Edematogenic activity

To determine the minimum edematogenic dose (MED) of BaV, subcutaneous injections of 50  $\mu$ L of different concentrations of BaV (2.5, 5.0, 7.5 and 10  $\mu$ g/animal) were administered in the animals' right foot pads ([Yamakawa et al., 1976](#)). A similar volume of sterile saline solution (control) was injected in the contralateral paw. The volume of each of the two paws was measured with a digital plethysmometer (EFF 304, Plethysmometer Paw', Insight Equipamentos Científicos) immediately after BaV had been administered (time zero) and 30 min, 1, 2, 4, 6 and 24 h later. Edema of the paw was expressed in mL and defined as the difference between the volumes of the experimental and control paws at time zero and subsequent time points. The inhibitory effect of AEBd on the edematogenic activity of BaV was assessed with four different protocols: (1) pre-incubation of BaV with AEBd (1:5 and 1:10 w/w for 30 min at 37 °C); (2) pre-treatment – administration of 48.3 and 145 mg/kg of AEBd (p.o.) or BA (100  $\mu$ L i.v.) 1 h before BaV was injected (2MED); (3) post-treatment – administration of 48.3, 145 and 283.3 mg/kg of AEBd (p.o.) or BA (i.v.) (100  $\mu$ L) immediately after BaV (2MED) had been injected; and (4) Administration of 48.3, 145 and 283.3 mg/kg of AEBd (p.o.) in combination with BA (100  $\mu$ L i.v.) immediately after BaV had been injected. Control groups with BaV + BA or BaV + saline were used in all the experiments. Saline or water was used depending on the

treatment (i.d. or p.o., respectively). Four animals were used for each treatment and dose combination.

### 2.6. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot

The interaction between AEBd and the proteins in BaV was assessed by SDS-PAGE as described by [Laemmli \(1970\)](#) using a 12.5% resolving gel and 5% stacking gel. Aliquots of BaV and AEBd were incubated for 30 min at 37 °C (1:10 venom:extract, w/w) and centrifuged at 1300 rpm for 5 min. The pellet and supernatant were then separated and analyzed under non-reducing conditions. After electrophoresis, one gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) and the other was used in the Western blot (Wb) ([Towbin and Gordon, 1984](#)). To this end, the proteins in the gel were transferred to a 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) in the Mini Trans-Blot® Cell system (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) under a constant 200 mA current and refrigeration for 3 h. Immediately after the transfer, the membrane was immersed overnight in blocking solution (TBS containing 5% skim milk, Molico-Nestlé-SP) at 4 °C. Next, the membrane was incubated with primary antibodies (BA) at a dilution of 1:1000 in TBS buffer for 1 h at ambient temperature under constant agitation. The membrane was then washed five times with saline and incubated with peroxidase-labeled rabbit anti-horse IgG antibody (Sigma–Aldrich, Israel) at a dilution of 1:1000 in TBS for 1 h at ambient temperature. Color was developed with DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrachloride) and 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction was stopped by successive washes with distilled water.

### 2.7. Proteolytic activity/zymography

Following the method described by [Monteiro dos Santos et al. \(2011\)](#), zymography was used to investigate the presence of proteolytic enzymes in BaV and AEBd and the blocking of the venom enzymes by the extract. For this assay, SDS-PAGE was prepared as described earlier but with 2 mg/mL of gelatin (Sigma) added to the gel. After the run the gel was washed for 30 min in buffer solution containing 50 mM Tris-HCl, 5 mM calcium chloride and Triton X-100 at 2.5%. After the wash, the gel was immersed in the incubation buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM calcium chloride, 2.5% Triton X-100 and 0.02% sodium azide) at 37 °C for 16 h. The gel was then stained with Coomassie Blue (Bio-Rad, R-250, CA, USA) for 120 min and slightly destained for 30 min. Proteolytic activity was indicated by the presence of clearer areas in the gel (the result of digestion of the substrate in the polyacrylamide-gelatin matrix), which contrasted with the blue background.

### 2.8. Statistical analysis

The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The means were compared by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post

test (for multiple comparisons). A significant level of  $p < 0.05$  was used.

### 3. Results

#### 3.1. Colorimetric assays

AEBd concentrations of total phenols, total tannins, condensed tannins, hydrolyzable tannins and flavonoids were determined by colorimetric assays (Table 1). Tannins were the predominant group of phenols and were present in greater concentrations than flavonoids. There was a high concentration of condensed tannins in the extract.

#### 3.2. Inhibition of phospholipase activity

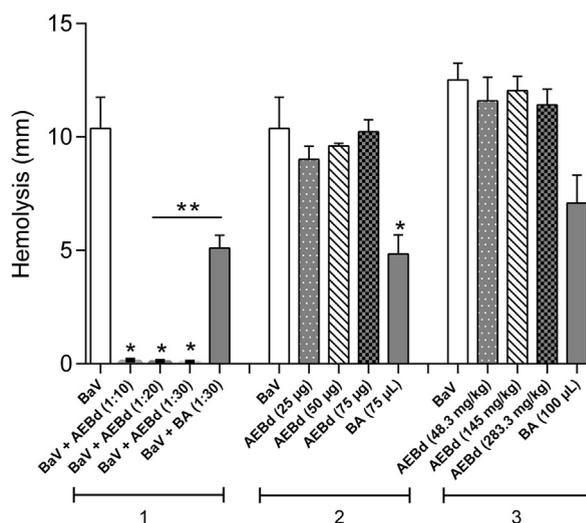
The BaV DMHi was 1.25  $\mu\text{g}$ . In the pre-incubation assays, the three concentrations of AEBd with BaV produced 100% inhibition of phospholipase  $A_2$  activity, while BA with BaV produced 53.7% inhibition. However, when AEBd was incorporated into the gel and BaV was applied afterward (i.e., without pre-incubation), there was no significant inhibition for the different doses of extract tested, whether for the concentrations used in the pre-incubation protocol or the concentrations used in folk medicine. When BA was incorporated into the gel (1:30, w/w), BaV phospholipase  $A_2$  activity was inhibited by 43.8% (Fig. 1).

#### 3.3. Inhibition of hemorrhagic activity

Hemorrhage caused by i.d. injection of BaV in mice was dose-dependent, the MHD determined here being 5  $\mu\text{g}$ /animal. The hemorrhagic activity of BaV was inhibited 100% when AEBd was pre-incubated with the venom in both ratios (1:5 and 1:10, venom:extract, w/w). AEBd was more effective than BA, which inhibited only 63.5% of hemorrhagic activity under the same test conditions (Fig. 2). With pre-treatment, inhibition was 40.5% when AEBd was administered in a dose of 725 mg/kg. This was more effective than treatment with the antivenom (BA), which inhibited only 38.3% of the hemorrhage (Fig. 3). With post-treatment, AEBd produced a 13.1% reduction in a 48.3 mg/kg dose. However, this was not statistically significant ( $p = 0.22$ ). BA reduced hemorrhagic activity induced by BaV by 24.2% ( $p = 0.03$ ) (Fig. 3).

#### 3.4. Inhibition of edematogenic activity

The MED for BaV was 2.5  $\mu\text{g}$ /animal; the effect was observed very soon after the injection and reached a peak in 30 min. The edematogenic activity of BaV was completely inhibited when AEBd was pre-incubated with the venom in the ratios 1:5 and 1:10 (venom:extract, w/w).



**Fig. 1.** Inhibition of the phospholipase activity of *Bothrops atrox* venom by aqueous extract of *Bellucia dichotoma*. (1) Pre-incubation (venom:extract, w/w); (2) AEBd or BA incorporated into the gel was prepared in the same concentrations as for pre-incubation; (3) AEBd or BA incorporated into the gel using concentrations based on those used in folk medicine. \* Significant difference between treatments (EABd or BA) and control group (BaV)  $p < 0.05$ . \*\* Significant difference between treatments (EABd) and standard treatment (BA)  $p < 0.05$ . Tukey's test,  $n = 4$  per group, three individual experiments.

For pre- and post-treatment (p.o.), statistically significant inhibition ( $p < 0.05$ ) was observed after 30 min for all the doses tested. Maximum inhibition occurred six hours after administration of the extract, when AEBd inhibited 87.9% of edematogenic activity in a dose of 145 mg/kg (pre-treatment) and 85.4% of activity in a dose of 283.3 mg/kg (post-treatment). Treatment with BA inhibited edematogenic activity by a maximum of 63.2% and 57.1% for pre- and post-treatment, respectively (Fig. 4A and B). Inhibition was even greater when the extract (p.o.) and BA (i.v.) were administered at the same time; six hours after administration of the extract, edema was reduced by 92.4% for a 283.3 mg/kg dose, making this combination therapy more effective than the recommended treatment with BA (Fig. 4C).

#### 3.5. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot

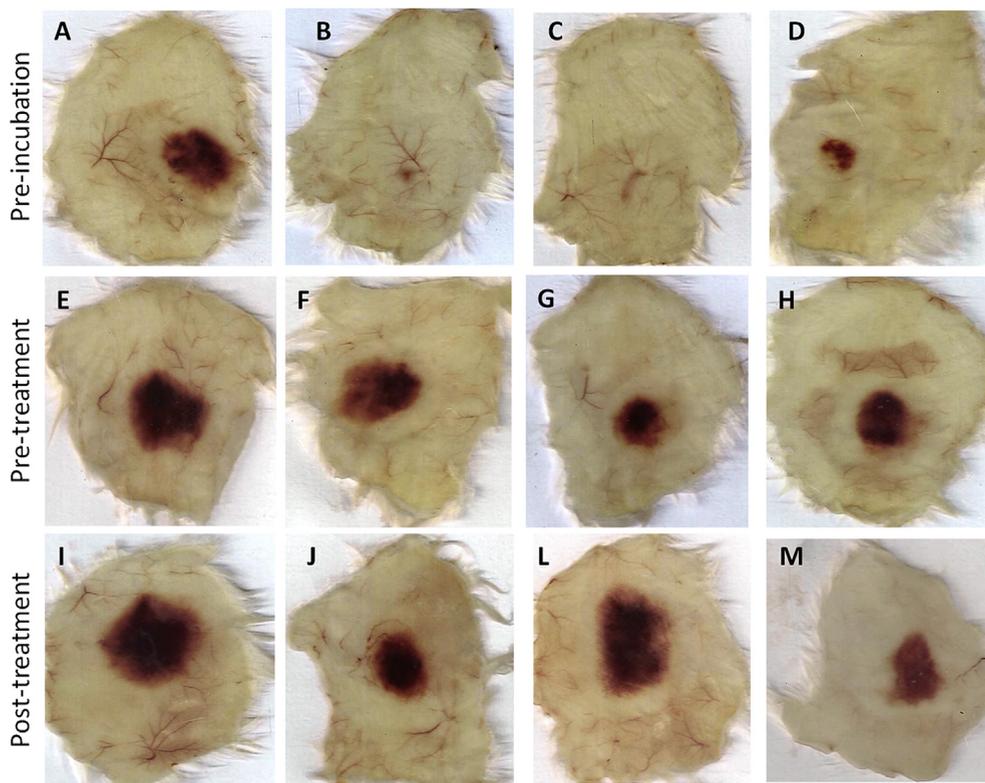
Fig. 5 shows the profiles of the proteins in BaV, in the supernatant of the mixture of venom and AEBd and in the pellet obtained from the mixture of AEBd and venom in the proportions tested. The protein bands visible in the BaV profile were not observed for the supernatant samples. High-molecular-mass proteins (above 205 kDa) and proteins between 50.7 and 86 kDa present in the pellet were

**Table 1**

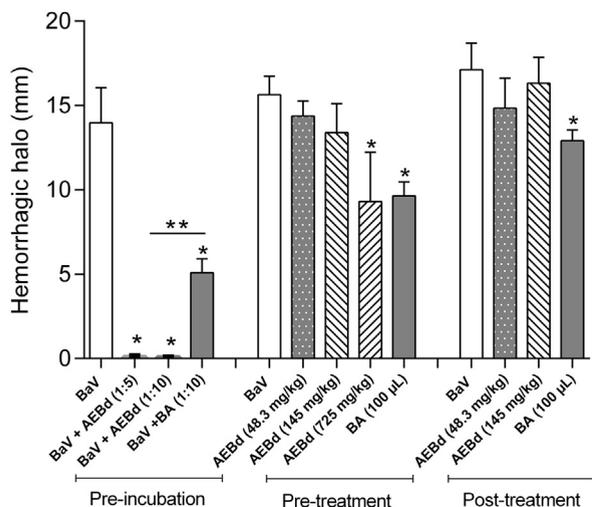
Total phenol, total tannin, hydrolyzable tannin, condensed tannin and total flavonoid content in aqueous extract of *Bellucia dichotoma*.

Sample	Total phenols	Total tannins	Hydrolyzable tannins	Condensed tannins	Total flavonoids
AEBd	17.74 $\pm$ 0.43	17.58 $\pm$ 0.59	35.32 $\pm$ 0.61	54.97 $\pm$ 3.17	0.14 $\pm$ 0.030

Results expressed in g per 100 g, dry basis. Mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).



**Fig. 2.** Animals' skin after tests to determine inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom by aqueous extract of *Bellucia dichotoma* and *Bothrops* antivenom using different treatments. 1) Pre-incubation: (A) BaV (10 µg) + saline; (B) BaV:AEBd (1:5, w/w); (C) BaV:AEBd (1:10, w/w); (D) BaV:BA (1:5, w/w). 2) Pre-treatment, (E) BaV (10 µg) + saline; (F) 145 mg/kg of AEBd; (G) 725 mg/kg of AEBd; (H) BA (100 µL). 3) Post-treatment, (I) BaV (10 µg) + saline; (J) 48.3 mg/kg of AEBd; (L) 145 mg/kg of AEBd and (M) BA (100 µL).



**Fig. 3.** Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom by aqueous extract of *Bellucia dichotoma* using different treatments. \* Significant difference between treatments (EABd or BA) and control group (BaV)  $p < 0.05$ . \*\* Significant difference between treatments (EABd) and standard treatment (BA)  $p < 0.05$ . Tukey's test,  $n = 4$  per group, three individual experiments.

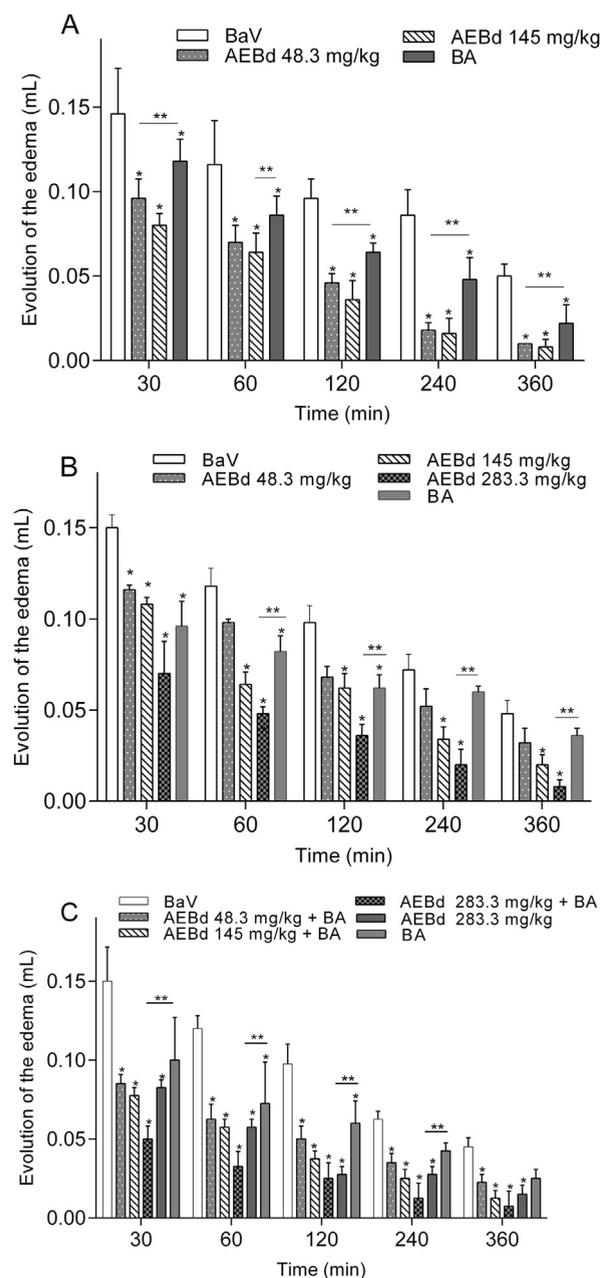
revealed weakly by Coomassie Brilliant Blue and by the antibodies in BA (Fig. 5A and B). However, the extract did not interfere with the low-molecular-mass protein bands between 7.4 and 27.8 kDa.

### 3.6. Detection of proteolytic activity by zymography

The zymogram for BaV (15 µg) (Fig. 6) showed five bands of approximately 70, 33.6, 30, 27.5 and 25 kDa with gelatinolytic activity. In the profiles for the mixtures of BaV and AEBd (1:5 and 1:10, w/w) the 70, 33.6 and 30 kDa bands were not visible; however, the 27.5 and 25 kDa bands were observed, together with a new band of approximately 20 kDa. The AEBd on its own also produced the three low-molecular-mass bands (27.5, 25 and 20 kDa, approximately).

## 4. Discussion

*Bellucia dichotoma* is widely used by riverside communities in western Pará, in the Brazilian Amazon, to treat snake bites (Moura et al., 2013). Before this study, the ability of AEBd to inhibit the action of BaV had been investigated using only a pre-incubation protocol. Here we carried out *in vivo* experiments using the same concentrations, the same administration route and the same



**Fig. 4.** Inhibition of the edematogenic activity induced by *Bothrops atrox* venom by aqueous extract of *Bellucia dichotoma* using different treatments. (A) Pre-treatment; (B) Post-treatment; (C) In combination with *Bothrops* antivenom. \* Significant difference between treatments (EABd or BA) and control group (BaV)  $p < 0.05$ , \*\* Significant difference between treatments (EABd) and standard treatment (BA)  $p < 0.05$ . Tukey's test,  $n = 4$  per group.

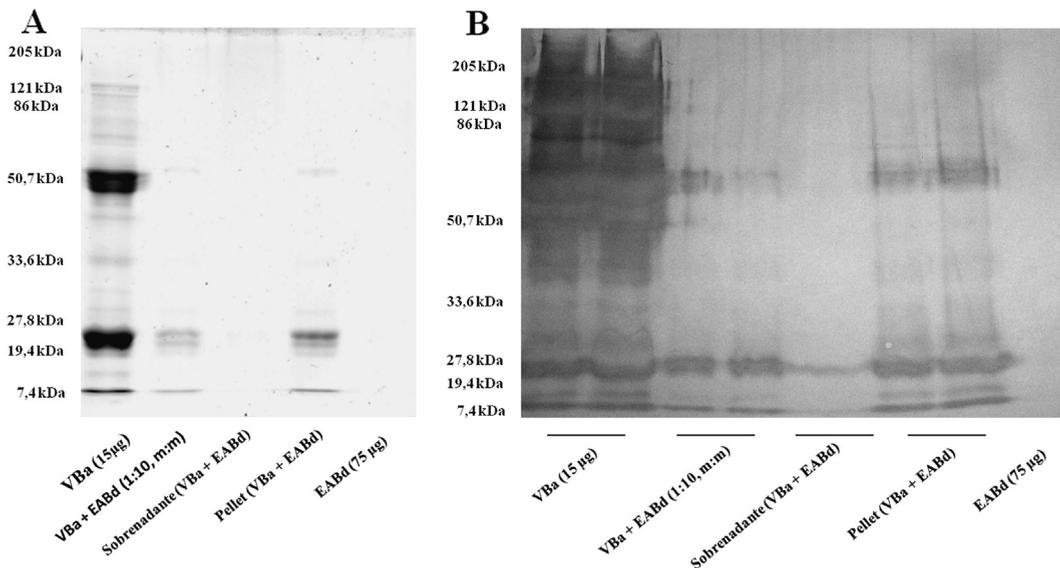
preparation method as the local population to validate and provide a scientific basis for the use of this plant species in folk medicine. We also compared the methodologies used by various authors to validate the anti-snake bite properties of plant species.

Plant extracts can contain a range of chemicals that are able to inhibit the harmful effects of snake venoms by acting directly as enzyme inhibitors, mineral chelators,

chemical inactivators or immunomodulators, which interact directly with target macromolecules (Mors et al., 2000). Phytochemical assays with AEBd carried out in earlier studies by our group showed that *B. dichotoma* contains flavonoids, terpenoids and condensed and hydrolyzable tannins (Moura et al., 2013). Here, we performed colorimetric assays to determine the concentrations of these phenolic compounds. These yielded the following concentrations: condensed tannins –  $54.97 \pm 3.17$  g/100 g; hydrolyzable tannins –  $35.32 \pm 0.61$  g/100 g; and flavonoids –  $0.14 \pm 0.030$  g/100 g. These results show the high tannin content in the aqueous extract of *B. dichotoma* and constitute extremely important new knowledge in the context of phytotherapeutic agents. Furthermore, they will be of great benefit in further studies to isolate the important phenolic compounds in this species.

PLA<sub>2</sub>s are a class of calcium-dependent enzymes that are abundant in the venom of snakes in the Viperidae family and exhibit a wide range of biological activities, including myotoxic, neurotoxic, cardiotoxic, hemolytic, hemorrhagic, hypertensive and anticoagulant activities (Kini, 2003; Lomonte et al., 2003). In the present study, AEBd completely inhibited the PLA<sub>2</sub> activity of BaV in a concentration-dependent manner when it was pre-incubated with the venom. However, when the protocol in which the EABd is incorporated to the gel in the final stage (i.e., without pre-incubation) was tested for the first time, the extract failed to inhibit phospholipase activity, unlike BA, which neutralized 43.8% of this activity under the same conditions. This shows that pre-incubation of the extract with *Bothrops atrox* venom may have removed ions that are important for the activity of PLAs in the venom.

Hemorrhage is one of the most serious symptoms of envenomation by snakes from genus *Bothrops* and is induced by metalloproteinases. These hemorrhagic toxins play an important role in vascular damage and the subsequent generation of ischemic zones, which are the main cause of necrosis in local tissues, potentially leading to amputation of the affected member (Warrell, 1992; Gutiérrez et al., 1998). Elucidating the mechanism by which jararhagin (a class III hemorrhagic metalloproteinase isolated from *B. jararaca*) induces hemorrhage, Baldo et al. (2010) reported that jararhagin accumulates near blood vessels, binding itself to components of the extracellular matrix, thereby compromising its integrity and inducing local bleeding. The major problem is that this local lesion, once induced, cannot be reversed by BA. Hence, it is important to investigate the effects of natural inhibitors that could be used in combination with serum therapy to treat snake bites. In our experiments, AEBd inhibited 100% of the hemorrhagic activity when pre-incubated with BaV, making it more effective than BA, (63.5% inhibition). This would suggest that inhibition may be the result of interaction between the compounds present in AEBd and the metalloproteinases in BaV, either by blocking of the metalloproteinase active site by AEBd or by the chelating of ions that are essential for the three-dimensional structure and activity of metalloproteinases (or hemorrhagins) (Da Silva et al., 2007). In the phytochemical study, we detected the presence of tannins in AEBd, which are known to be able



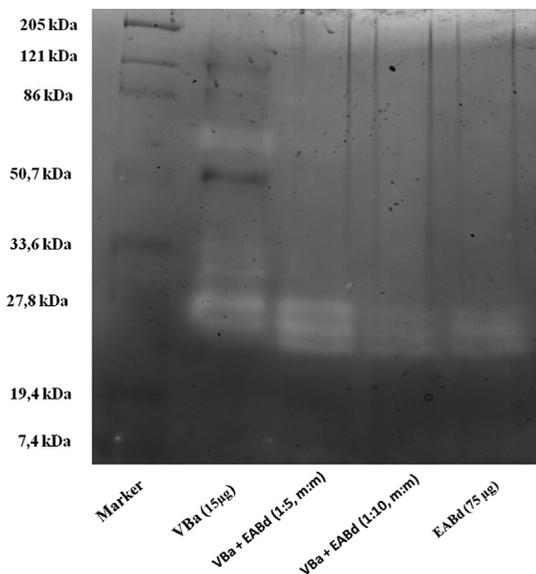
**Fig. 5.** Interaction between aqueous extract of *Bellucia dichotoma* and *Bothrops atrox* venom. The mixture (venom:extract) was centrifuged and the pellet and supernatant were analyzed by (A) polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and (B) Western blot.

to chelate metal ions. Condensed tannins, for example, are derived from polymeric forms of catechin and epicatechin, which can chelate the zinc ion in the active site of hemorrhagic metalloproteinases (Castro et al., 1999). Polyphenolic compounds can precipitate proteins and form complexes with metals such as  $Zn^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  (Patiño et al., 2012), which could explain the very effective inhibition of PLA<sub>2</sub> activity (calcium-dependent) and hemorrhagic activity (zinc-dependent) observed in this study

after pre-incubation of BaV with AEBd. This finding of 100% inhibition may therefore not be due to the ability of tannins to bind specifically to proteins in the venom during pre-incubation but to their ability to chelate ions present in the venom during pre-incubation (Vejjayan et al., 2007; Sia et al., 2011). We were able to confirm this ion-chelating activity as in the post-treatment there was no inhibition of hemorrhagic activity and in the pre-treatment 40.5% inhibition was observed when the extract was administered in a relatively high dose (fifteen times the dose used by the population). To analyze inhibition of hemorrhagic activity we used protocols with doses of 48.3, 145 and 725 mg/kg, the latter corresponding to 15 times the dose used by the local population, to confirm the 100% inhibition observed with pre-incubation. However, even a dose as high as 725 mg/kg administered orally failed to inhibit hemorrhagic activity completely, indicating that when assessing the anti-snake bite properties of plant extracts, methods that reflect the way these extracts are used in folk medicine should be employed rather than pre-incubation.

The profiles for BaV, the AEBd and the combination of AEBd and BaV observed after SDS-PAGE followed by Western blot showed that the components in the extract did not have any proteolytic effect on BaV (Fig. 5). The disappearance of some bands from the venom after pre-incubation with the extract may be a result of the probable chelating effect of tannins in the extract on proteins in the venom, forming high-molecular weight complexes which do not penetrate the gel. It should be noted that the enzymes in the extract did not act on the venom as there were no low-molecular-mass bands (indicative of enzymatic cleavage) in the Western blot.

Inflammation, one of the signs of which is edema, is a multimediated process involving proinflammatory lipid or protein compounds from various complex enzyme



**Fig. 6.** Zymogram showing the gelatinolytic activity of *Bothrops atrox* venom and aqueous extract of *Bellucia dichotoma*. Clear bands indicate the presence of enzymes with gelatinolytic activity in *B. atrox* venom or aqueous extract of *B. dichotoma*.

pathways. BaV induces a significant acute inflammatory reaction characterized by increased vascular permeability and leukocyte influx at the site where it is injected. The migrating cells consist mainly of macrophages and neutrophils, which start to accumulate in the early stages of the response to the venom (Moreira et al., 2012). Although various studies have been carried out, the local effects of the venom have yet to be fully elucidated, and the search for substances that could interrupt or antagonize the powerful local inflammatory response induced by *Bothrops* venoms remains a challenge (Lomonte et al., 1993; Melo et al., 2010). Here we have shown that *B. dichotoma* was effective in inhibiting the edematogenic activity of BaV in all the protocols tested. Administration of AEBd together with BA yielded promising results, as the extract enhanced the antiedematogenic effect of the antivenom. The aim of this study was to show that, once studies have been performed to satisfy prevailing Ministry of Health regulations, *B. dichotoma* extract could be used to enhance the effect of serum therapy rather than replace it, as treatment with the specific biological agent effectively reverses the systemic effects induced by BaV. It is worth noting that AEBd was more effective in inhibiting edematogenic activity than the standard treatment with BA in all the protocols tested.

Many studies have shown the ability of plant extracts to inhibit the activities of snake venoms, but most of these only used pre-incubation. Here we have compared the inhibiting effect of AEBd on BaV using different experimental protocols. The pre-incubation protocol was the most effective in inhibiting the effects of the venom; however, this method can overestimate the anti-snake bite activity of the extract, as mentioned earlier. In the tests simulating traditional use, i.e., oral administration of the extract as pre- or post-treatment or in combination with the antivenom, the extract was more effective in inhibiting edema induced by the venom than the standard treatment. The most effective dose was 283.3 mg/kg, and the most effective treatment was AEBd in combination with BA. These results provide scientific evidence to support the Cucurunã community's use of *B. dichotoma* orally either as prophylaxis or after envenomation.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the National Institute of Toxin Science and Technology (INCTTOX) (ref. no. 573790/2008-6/CNPq, 1217/2011/CAPES) for providing financial support. They would also like to express their gratitude to the members of the Cucurunã community in Santarém, PA, and to Dr. Regina Célia Viana Martins at the Botanical Laboratory in the EMBRAPA herbarium for identifying the plants. MCS is a recipient of a CNPq-PQ grant (ref. no. 302615/2010-5).

## Appendix A. Transparency document

Transparency document related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.009>.

## References

- Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T.M., Moura-da-Silva, A.M., 2010. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and *in situ* hydrolysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e727.
- Baumgratz, J.F.A., 2013. Lista de espécies da flora do Brasil: *Bellucia dichotoma*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23691> (accessed on 10.10.13.).
- Bochner, R., Struchiner, C., 2003. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. *Cad. Saúde Pública* 19, 7–16.
- Borges, C.C., Cavalcanti-Neto, A.J., Boechat, A.L., Francisco, C.H., Arruda, M.R.E., Dos-Santos, M.C., 1996. Eficácia da espécie vegetal *Peltodon radicans* (Labiatae, Lamiaceae) na neutralização da atividade edematogênica e ineficácia do extrato vegetal Específico Pessoa na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops atrox*. *Rev. Univ. do Amazon. Série: Ciências Biol.* 1, 97–113.
- 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.
- Borges, M.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Andrião-Escarso, S.H., Diniz, H., Hamaguchi, A., Quintero, A., Lizano, S., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., Homsí-Brandeburgo, M.I., 2000. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A<sub>2</sub>. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 127, 21–30.
- Borges, M.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Oliveira, F., Fransheschi, A.M., Rucavado, A., Giglio, J.R., Homsí-Brandeburgo, 2001. Neutralizing of proteases from *Bothrops* snake venoms by aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon* 39, 1863–1869.
- Cardoso, J.L., Fan, H.W., França, F.O., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S.A., Avila, A., Sano-Martins, I.S., Tomy, S.C., Santoro, M.L., Chudzinski, A.M., Castro, S.C.B., Kamiguti, A.S., Kelen, E.M.A., Hirata, M.H., Mirandola, R.M.S., Theakston, R.D.G., Warrell, A., 1993. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *J. Q. Med.* 86, 315–325.
- 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.
- Cardoso, D.F., Yamaguchi, I.K., Moura-da-silva, A.M., 2009. Produção de soros antioxinases e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo p. 419.
- 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.
- Cavalcante, W.L.G., Campos, T.O., Pai-Silva, M.D., Pereira, P.S., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Gallacci, M., 2007. Neutralization of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J. Ethnopharmacol.* 112, 490–497.
- Chabariberi, R.A.O., Pozzi, A.C.S., Zeraik, M.L., Yariwake, J.H., 2009. Determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-JV. *Braz. J. Pharmacog.* 19, 860–864.
- Costa, H.N.R., Dos-Santos, M.C., Alcântara, A.F.C., Silva, M.C., França, R.C., Piló-Veloso, D., 2008. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae). *Quim. Nova* 31, 744–750.
- Da Silva, C.J., Jorge, M.T., Ribeiro, L.A., 2003. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon* 41, 251–255.
- Da Silva, J.O., Coppede, J.S., Fernandes, V.C., Santa'ana, C.D., Ticali, F.K., Mazzi, M.V., Giglio, J.R., Pereira, P.S., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2005. Antihemorrhagic, antinucleolytic, and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. *J. Ethnopharmacol.* 100, 145–152.
- Da Silva, J.O., Fernandes, R.S., Ticali, F.K., Oliveira, C.Z., Mazzi, M.V., Franco, J.J., Giuliett, S., Pereira, P.S., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2007. Triterpenoid saponins, new metalloproteinase snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon* 50, 283–291.
- Dougherty, E.R., 2002. An Introduction to Morphological Image Processing. In: A Publication of SPIE, vol. TT9. The International Society for Optical Engineering.
- Dougherty, E.R., Lotufo, R.A., 2003. Hands-on Morphological Image Processing (College Station, Texas, U.S.A. and Campinas, SP, Brazil).
- Estrada, G.S., Jimenez, S.L., Alarcon, P.J., Vargas, L.J., 2010. Application of ultrasound in the dissolution of potential antiophidian compounds

- from two ethanolic extracts of two species of Heliconias. *Ultrason. Sonochem.* 17, 756–759.
- Fernandes, R.S., Costa, T.R., Marcussi, S., Bernardes, C.P., Menaldo, D.L., Rodríguez González, I.L., Pereira, P.S., Soares, A.M., 2011. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 17, 85–93.
- Gonzalez, R.C., Woods, R.E., Eddins, S.L., 2009. *Digital Image Processing Using MATLAB*, second ed. Gatesmark Publishing, Knoxville, TN.
- Guerra, C.E., Xavier, A.R., Andrade, A.J.N., 2011. Watershed Threshold and Gray Level Morphology Applied to Object Detecting in Remote Sensing and Petrographics images. In: 12th International Congress of the Brazilian Geophysical Society in Rio de Janeiro, Brazil.
- Gutiérrez, J.M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26, 411–413.
- Gutiérrez, J.M., León, G., Rojas, G., Lomonte, B., Rucavado, A., Chaves, F., 1998. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 36, 1529–1538.
- Gutiérrez, J.M., Theakston, R.D., Warrell, D.A., 2010. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, 0727–0731.
- Izidorio, L.F.M., Rodrigues, V.M., Rodrigues, R.S., Ferro, E.V., Hamaguchi, A., Giglio, J.R., Homs-Brandeburgo, M.I., 2003. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). *Biochimie* 85, 669–675.
- Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon* 42, 827–840.
- Kondo, H.S., Ikezawa, R., Murata, A., Ohsaka, 1960. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 13, 43–51.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.A., 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93–105.
- 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.
- Magalhães, A., Santos, G.B., Verdam, M.C.S., Fraportid, L., Malheiro, A., Lima, E.M., Dos-Santos, M.C., 2011. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsippanthes chamaedrys*. *J. Ethnopharmacol.* 134, 82–88.
- Maiorano, V.A., Marcussi, S., Daher, M.A.F., Oliveira, C.Z., Couto, L.B., Gomes, O.A., França, S.C., Soares, A.M., Pereira, P.S., 2005. Antiothidic properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J. Ethnopharmacol.* 102, 364–370.
- Melo, P.A., Pinheiro, D.A., Ricardo, H.D., Fernandes, F.F.A., Tomaz, M.A., El-Kik, C.Z., Strauch, M.A., Fonseca, T.K., Sifuentes, D.N., Calilelias, S., Buarque, S.D., Brito, F.V., Silva, A.J.M., Costa, P.R.R., 2010. Ability of a synthetic coumestan to antagonize *Bothrops* snake venom activities. *Toxicon* 55, 488–496.
- Mendes, M.M., Vieira, S.A.P.B., Gomes, M.S.R., Paula, V.F., Alcântara, T.M., Homs-Brandeburgo, M.I., Dos Santos, J.I., Magro, A.J., Fontes, M.R.M., Rodrigues, V.M., 2013. Triacontyl p-coumarate: an inhibitor of snake venom metalloproteinases. *Phytochemistry* 86, 72–82.
- Ministério da Saúde, 2010. *Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso/Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância de Saúde*, eighth ed. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília. 444 pp.
- Ministério da saúde, 2013. *Guia de Vigilância Epidemiológica: Acidentes ofídicos*. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual\\_aap.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf) (accessed on 18.10.13.).
- Mole, S., Waterman, P.G., 1987a. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia Berl.* 72, 137–156.
- Mole, S., Waterman, P.G., 1987b. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques of biochemically defining tannins. *Oecologia Berl.* 72, 148–156.
- Monteiro-Dos-Santos, J., Conceição, K., Seibert, C.S., Marques, E.E., Ismael Silva Jr., P., Soares, A.B., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., 2011. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of potamogetryon cf. henlei. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1368–1377.
- Moreira, V., Dos-Santos, M.C., Nascimento, N.G., Silva, H.B., Fernandes, C.M., D'Império Lima, M.R., Teixeira, C., 2012. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom. *Toxicon* 60, 12–20.
- Mors, W.B., Nascimento, M.C., Pereira, B.M.R., Pereira, N.A., 2000. *Phytochemistry* 55, 627–642.
- 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. *J. Med. Plants Res.* 7, 2330–2337.
- Oliveira, C.Z., Maiorano, V.A., Marcussi, S., Sant'Ana, C.D., Januário, A.H., Lourenço, M.V., Sampaio, S.V., França, S.C., Pereira, P.S., Soares, A.M., 2005. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *J. Ethnopharmacol.* 98, 213–216.
- 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). *Bio-médica* 32, 365–374.
- Patiño, A.C., Benjumea, D.M., Pereañez, J.A., 2013. Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renalmia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: comparison of wild and *in vitro* propagated plants. *J. Ethnopharmacol.* 149, 590–596.
- 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.
- Strauch, M.A., Tomaz, M.A., Machado, M.M., Ricardo, H.D., Cons, B.L., Fernandes, F.F.A., El-Kik, C.Z., Azevedo, M.A.S., Melo, P.A., 2013. Antiothidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. *J. Ethnopharmacol.* 145, 50–58.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4267–4274.
- Ticli, F.K., Hage, L.L.S., Cambraia, R.S., Pereira, P.S., Magro, A.J., Fontes, M.R.M., Stábeli, R.G., Giglio, J.R., França, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon* 46, 318–327.
- Towbin, H., Gordon, I., 1984. Immunoblotting and dot-immunobinding: current status and outlook. *J. Immunol. Meth.* 72, 313–320.
- Vejayan, J., Ibrahim, H., Othman, I., 2007. The potential of *Mimosa pudica* (mimosaceae) against snake envenomation. *J. Trop. For. Sci.* 19, 189–197.
- Veronese, E.L.G., Esmeraldino, L.E., Trombone, A.P.F., Santana, A.E., Bechara, G.H., Kettelhut, I., Cintra, A.C.O., Giglio, J.R., Sampaio, S.V., 2005. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A.D.C. (Apocynaceae). *Phytomedicine* 12, 123–130.
- Warrell, D.A., 1992. The global problem of snake bite: its prevention and treatment. In: Gopalakrishnaakone, P., Tu, C.K. (Eds.), *Recent Advances in Toxinology Research*. National University of Singapore Publishers, Singapore, pp. 121–153.
- Warrell, D.A., 2004. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: Campbell, J.A., Lamar, W.W. (Eds.), *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock Publishing Associates, NY, USA, pp. 709–761.
- 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) (accessed on 25.03.13.).
- 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) (accessed 28.09.13.).
- Willis, R.B., Allen, P.R., 1998. Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. *Analyst* 123, 435–439.
- Yamakawa, S.A., Nozaki, M., Hokawa, Z., 1976. Fractionation of sakishimababu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. pp. 97–109. In: Ohsaka, A., Hayashi, K., Saway, Q.Y. (Eds.), *Animal, Plant and Microbial Toxins*, vol. 1. Plenum, New York, p. 555.

## CAPÍTULO III

Versão em português do artigo submetido em agosto de 2016 à revista *Journal of Ethnopharmacology* (ISSN 0378-8741)

### **Potencial de inibição das atividades biológicas do veneno de *Bothrops atrox*, pelos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae): comparação dos espécimes coletados no Estado do Pará e Amazonas, Brasil**

Valéria Mourão de Moura<sup>a,b\*</sup>, Luana Yamille Andrade de Souza<sup>b</sup>, Noranathan da Costa Guimarães<sup>c</sup>, Iliá Gilmará Carvalho dos Santos<sup>a,b</sup>, Patrícia Danielle Oliveira de Almeida<sup>d</sup>, Ricardo Bezerra de Oliveira<sup>c</sup>, Rosa Helena Veras Mourão<sup>c</sup>, Maria Cristina Dos-Santos<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>*Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.*

<sup>l</sup>*Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.*

<sup>c</sup>*Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Laboratório de Bioprospeção e Biologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA, Brasil.*

<sup>d</sup>*Laboratório de Atividade Biológica – Biophar, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, AM, Brasil.*

#### **Resumo**

**Relevância etnofarmacológica:** As cascas de *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) são bastante utilizadas em casos de envenenamento por serpentes na região Oeste do Pará, Brasil. A eficácia do extrato aquoso de espécimes coletada em Santarém-PA, foi comprovada cientificamente para algumas atividades biológicas do veneno de *Bothrops atrox* (VBa). No presente estudo foram avaliados os componentes e os potenciais antiofídicos das cascas de *B. dichotoma*, coletadas em Manaus, Amazonas (EABd-MAO) e Santarém, Pará (EABd-STM), Brasil. **Material e métodos:** O perfil fitoquímico dos extratos aquosos foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e as concentrações dos compostos fenólicos,

foram determinadas por ensaios colorimétricos. O potencial de bloqueio dos extratos, foi testado frente às atividades do VBa in vitro (fosfolipásica A<sub>2</sub>, coagulante, gelatinolítica) e in vivo (desfibrinante e edematogênica). Para verificar a interação entre o VBa e os extratos, foram realizados eletroforese em SDS-PAGE e *Western Blot*. A citotoxicidade dos extratos foi avaliada em linhagem de fibroblasto humano MRC-5 e o potencial antioxidante pelos métodos de DPPH e em cultura de células. **Resultados:** Não houve diferença entre os perfis fitoquímicos dos extratos. O EABd- MAO apresentou maiores concentrações de fenóis totais, taninos totais, taninos hidrolisáveis do que EABd- STM. Os extratos foram capazes de bloquear 100% a atividade fosfolipásica e coagulante do VBa (pré-incubação). Quando aplicados diretamente ao gel na atividade fosfolipásica não houve redução significativa, porém, obtiveram bloqueio máximo de 25% (EABd-MAO), e 16% (EABd-STM) no método sem pré-incubação para atividade coagulante. Nas doses conforme uso tradicional (48,3, 145, 289,8 mg/kg), sem pré-incubação, ambos os extratos bloquearam 100% a atividade coagulante do VBa. In vivo, os extratos não foram capazes de bloquear a atividade desfibrinante, mas foram eficazes no bloqueio da atividade edematogênica de VBa. Nos perfis dos extratos pré-incubados com VBa, não foram observadas todas as bandas proteicas, e foram fracamente reveladas pelos anticorpos presentes no antibotrópico. Ambos extratos apresentaram alto potencial antioxidante. EABd - MAO com atividade superior no método de DPPH e o EABd- STM, em cultura de células. Os extratos de *B. dichotoma* não apresentaram efeito citotóxico. **Conclusão:** Nossos resultados mostram que a diferença entre os teores de compostos fenólicos presentes nos extratos, não influenciou o potencial de bloqueio apresentado pelos extratos de *B. dichotoma*, coletados em dois locais distintos. Os resultados fornecem subsídios importantes para o controle de qualidade da matéria prima que, após estudos preconizados, poderá ser utilizada para produção de um fitoterápico para o tratamento complementar das ações locais, induzidas por espécies do gênero *Bothrops* sp., que não são neutralizadas eficazmente pelo antibotrópico.

**Palavras-Chave:** *Bellucia dichotoma*, acidentes ofídicos, plantas antiofídicas, medicina popular, *Bothrops*.

## 1. Introdução

O acidente ofídico causado por *Bothrops atrox* produz acentuado dano tecidual local que incluem sintomas como dor, edema, hemorragia, necrose, e adicionalmente distúrbios sistêmicos (França e Málaque, 2009). De uma forma geral, são descritas três atividades fisiopatológicas para o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*: proteolítica, mais definida como inflamatória aguda, hemorrágica e coagulante (Warrell, 2004). Porém, essas atividades são extremamente complexas e atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar em sinergismo e induzir uma única ação ou uma determinada toxina, desencadear várias atividades biológicas (França e Málaque, 2009; Bustilo et al., 2015).

Os venenos botrópicos são compostos por famílias de proteínas, como L-amino ácido oxidase (LAAO), lectina-like do tipo C (CLECL) metaloproteínases (SVMP), serinoproteases (SVSP), e fosfolipases (PLA<sub>2</sub>), sendo as mais abundantes e frequentemente correlacionadas com os sintomas clínicos do envenenamento (Gutiérrez, 2002; Sousa et al., 2013). As SVSP são geralmente denominadas trombina-símile, pois atuam diretamente na clivagem do fibrinogênio plasmático em fibrina, sem a necessidade de participação da trombina endógena. Essas enzimas estão envolvidas nos distúrbios da coagulação (Serrano e Maroun, 2005) e as PLA<sub>2</sub>, com os efeitos locais e miotoxicidade, ações observadas nos acidentados por serpentes do gênero *Bothrops* sp. (Gutiérrez e Lomonte, 2013). SVMP são enzimas multifuncionais que participam nos sintomas locais e sistêmicos, tais como na indução da hemorragia local, da reação inflamatória, da ativação de fatores de coagulação e na inibição da agregação plaquetária (Moura-da-Silva et al., 2007).

Apesar das estratégias do Ministério da Saúde do Brasil em distribuir imunobiológicos para as Secretarias Estaduais de Saúde, frequentemente, em regiões distantes, os casos de envenenamentos por serpentes são tratados com preparados populares elaborados com plantas medicinais regionais, que são usados ou como coadjuvantes à soroterapia ou como medicamento alternativo, administrado na falta desses antivenenos (Mors et al., 2000; Otero et al., 2000; Cardoso, 2009).

Muitas das plantas indicadas para tratamento de envenenamento por serpentes, foram identificadas, porém a maioria nunca foi estudada para verificar suas ações antiofídicas e validar os usos tradicionais, pois são conhecidas pelos raizeiros e curandeiros apenas pelos nomes populares (Vilar et al., 2005). O grande problema do reconhecimento das plantas pelos nomes populares é que estes variam de região para região, dificultando ainda mais os estudos científicos. Outros fatores importantes e que devem ser levados em consideração são os

ambientais como: clima, tipo de solo, local de coleta, que podem influenciar na biossíntese dos metabólitos secundários e, conseqüentemente, no bloqueio da atividade biológica induzida pelo veneno, demonstrando a necessidade de estudos que avaliem os efeitos de uma determinada espécie vegetal coletada em diferentes localidades (Vanhaelen et al., 1991).

*Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) é uma espécie endêmica da região Amazônica, com distribuição geográfica em quatro Estados da região Norte: Acre, Amazonas, Amapá e Pará (Baumgratz, 2013). Conforme levantamento etnofarmacológico, em comunidades da região Oeste do Pará, suas cascas são utilizadas para tratar Acidentes Ofídicos (Moura et al., 2013; 2014; 2015). O potencial de bloqueio do extrato aquoso da casca de *B. dichotoma*, proveniente do estado do Pará, Brasil, foi testado contra os efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca* (atividade hemorrágica) e *Bothrops atrox* (atividades hemorrágica, fosfolipásica, edematogênica e coagulante), o qual apresentou 100% de inibição frente todas atividades avaliadas, no protocolo de pré-incubação (veneno:extrato) (Moura et al., 2013, Moura et al., 2015). No entanto, quando testado por via oral, de acordo com uso tradicional, foi bastante eficaz, apenas, no bloqueio da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox* (Moura et al., 2014). No presente estudo foi avaliado a influência da localidade geográfica sobre os extratos aquosos de *Bellucia dichotoma*, obtidos de espécimes oriundas de Santarém, Pará e de Manaus, Amazonas, Brasil frente às atividades fosfolipásica A<sub>2</sub>, coagulante, gelatinolítica, edematogênica e desfibrinante induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*. Além de avaliar o potencial antioxidante e a citotoxicidade dos extratos frente a fibroblastos humanos da linhagem MRC-5.

## **2. Material e Métodos**

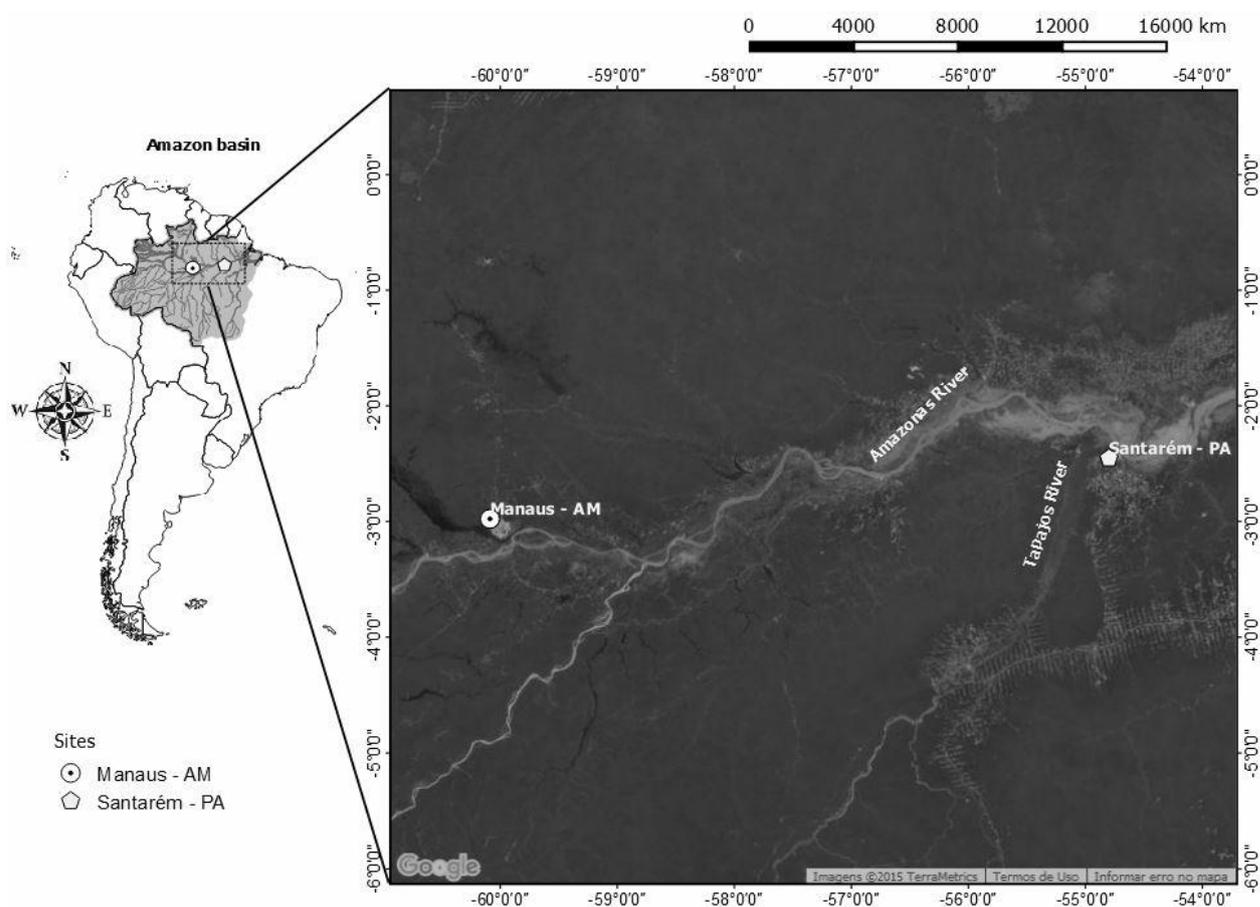
### **2.1. Material Vegetal**

#### **2.1.1. Coleta e identificação de *Bellucia dichotoma***

Amostras de *Bellucia dichotoma* foram coletadas durante o mês de março de 2013, sempre às 9 horas da manhã, em dois locais distintos: 1) Estado do Amazonas, Bairro do Tarumã na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil (2°58'46.62" S e 60° 5'20.86" W), área de Floresta tropical de baixa altitude, latossolos amarelos (Fig. 1). O clima predominante em Manaus segundo a classificação climática de Koppen é o tipo Am, ou seja, equatorial quente e úmido, com uma estação seca bem definida e outra com elevados índices pluviométricos; 2) Estado do Pará, nas proximidades da comunidade de Cucurunã, Santarém, Pará, Brasil

(02°27'21.0" S e 54°47'45.7" W), área de savana amazônica, solo arenoso (Fig. 1). O clima predominante em Santarém é quente e úmido, segundo a classificação climática de Köppen, é do tipo climático Am. Em cada ambiente (Manaus e Santarém), foram coletadas amostras de três indivíduos da mesma espécie.

A identificação botânica das espécies foram realizadas no Herbário EMBRAPA/Amazônia Oriental (Belém - PA, Brasil), e a exsicata encontra-se depositada sob o código (IAN) 185213. No Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas – INPA, a exsicata encontra-se depositada sob o código INPA N<sup>o</sup> 268216. Uma cópia da exsicata foi também depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, sob o número de registro 10071.



**Fig.1.** Área de coleta dos espécimes de *Bellucia dichotoma* Cogn.. Mapa elaborado por Me. Fábio Guerra dos Santos, Engenheiro Florestal do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis - IBAMA. Distância entre Manaus - Amazonas e Santarém-Pará: linha reta (597 km), por estradas (2115 km).

### 2.1.2. Obtenção dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* (EABd)

Os extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* provenientes de Manaus - AM (EABd - MAO) e Santarém - PA (EABd - STM), 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 (Moura et al., 2014). Para isto, foram utilizados 50 g de pó das cascas de *Bellucia dichotoma* extraído 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 (chá por decoção). Após esfriar, retirou-se 150 mL, que é a quantidade equivalente a um copo de chá, como utilizado popularmente. Em seguida, foi liofilizado e o peso final seco do extrato foi de 2,9 g. O peso de 60 kg foi utilizado como base para calcular as dosagens para os animais, pois este valor é a média de peso de um adulto nesta região do Brasil. Como a população local utiliza um copo de chá de *Bellucia dichotoma* três vezes ao dia, ou até mesmo antes de entrar em áreas arborizadas, foram utilizadas nos testes in vitro as doses de 48,3, 145 e 289,8 mg/kg, que equivalem a dose única utilizada pela população (48,3 mg/kg), três vezes essa dose (145 mg/kg) e seis vezes a dose (289,8 mg/kg). E nos testes in vivo (atividades desfibrinante e edematogênica) foi utilizada a dose de 289,8 mg/kg, que foi a mais eficaz nos ensaios in vivo como descrito no trabalho de Moura et al., 2014.

### **2.1.3. Perfil fitoquímico dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada**

A triagem fitoquímica dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* provenientes de Manaus - AM e Santarém - PA, foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de acordo com Marini-Bettòlo et al. (1981). Para isto, foram utilizados reveladores e padrões específicos, visando detectar as seguintes classes de metabólitos secundários: ácidos graxos, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, terpenoides, taninos (hidrolisáveis e condensados) e alcaloides.

### **2.1.4. Ensaios colorimétricos**

A determinação de fenóis totais presentes nos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* provenientes de Manaus - AM e Santarém - PA, foi realizada a 510 nm no espectrofotômetro Quimis Q -108U2VL utilizando FeCl<sub>3</sub> (Vetec) como agente cromogênico (Mole e Waterman, 1987). Uma curva padrão foi feita com ácido tânico (Sigma), nas concentrações de 0,05 a 0,8 mg/mL (R= 0,99). Os taninos totais foram determinados segundo a metodologia de Hagerman e Butler (Mole e Waterman, 1987) após a precipitação com albumina sérica bovina (BSA, Sigma) em tampão de acetato de sódio pH 4,9 e FeCl<sub>3</sub> foi utilizado para desenvolvimento da cor. A absorbância foi lida a 510 nm, utilizando ácido tânico como padrão (0,2 a 0,8 mg/mL, R= 0,99). Os taninos hidrolisáveis foram determinados após complexação com iodato de potássio (Vetec) segundo metodologia de Willis e Alen (1998). A absorbância foi lida em 550

nm e ácido tânico foi utilizado como padrão (0.05 a 0.6 mg/mL, R= 0,99). Os taninos condensados foram determinados segundo Sun et al. (1998) utilizando vanilina (Vetec) em meio ácido para desenvolvimento da cor. A catequina hidratada (Sigma) foi utilizada como padrão (0,1 a 1,0 mg/mL, R= 0,99) e absorvância foi lida em 500 nm.

## **2.2. Obtenção do veneno de *Bothrops atrox* (VBa) e do soro antibotrópico (SAB)**

O veneno foi 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 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - nº 14018). Os espécimes foram mantidos no biotério das Faculdades Integradas do Tapajós- FIT, Santarém-PA, sob a responsabilidade do MSc. Hipócrates de Menezes Chalkidis e com autorização do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA número 26/2013. O veneno foi coletado *in natura*, liofilizado e mantido a -20 °C, até o momento do uso. O soro antibotrópico (SAB) utilizado foi o de Lote nº: 105113B, produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

## **2.3. Animais**

Camundongos *Swiss* do sexo masculino (34 - 41 g), foram obtidos do Biotério da Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brasil. Os animais foram mantidos em condições-padrão (temperatura  $22 \pm 1$  °C, ciclo de 12 h claro/12 h escuro) e acondicionados em gaiolas-padrão, com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes da Lei Federal 11.794 e com aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade do Estado do Pará (UEPA) com o número de protocolo 43/11.

## **2.4. Ensaios de bloqueio das atividades induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox***

### **2.4.1. Atividade fosfolipásica**

A avaliação da atividade da Fosfolipase A<sub>2</sub> induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* foi mensurada pela ação hemolítica indireta em gel de agarose de acordo com Gutiérrez et al., 1988, com modificações. A dose mínima hemolítica indireta (DMHi) foi definida 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* foram avaliados de acordo com os seguintes protocolos: (1) extrato aquoso ou soro antibotrópico foram incorporados na etapa final do preparo do gel, de acordo com o método proposto por Moura et al. (2014) utilizando concentrações baseadas na utilização popular (48,3, 145 e 289,8 mg/kg, e soro antibotrópico 100 µL). (2) pré-incubação por 30 minutos a 37 °C dos extratos aquosos com duas DMHi de VBa nas proporções de 1:10, 1:20 (veneno: extratos m:m) e os controles com veneno + salina ou veneno + soro antibotrópico. A atividade enzimática foi expressa como percentual de inibição, onde 100% de inibição correspondem à ausência do halo hemolítico. Cada ensaio foi realizado em triplicata e expresso como média ± desvio padrão da média.

#### **2.4.2. Atividade coagulante**

A atividade coagulante foi realizada de acordo com Theakston; Reid, 1983, com modificações. Para a determinação da dose mínima coagulante (DMC), definida como a concentração mínima de veneno capaz de coagular 100 µL de plasma em 60 s, foram utilizadas as diferentes concentrações obtidas na diluição seriada do veneno de 1000 até 15,6 µg/ mL. O tempo necessário para a formação da rede de fibrina na forma de coágulo foi medido em segundos e observado visualmente. O efeito bloqueador dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* na atividade coagulante do veneno foi avaliado das seguintes formas: (1) os extratos foram incubados previamente com a 2DMC do veneno (4,5 µg) por 30 minutos a 37 °C nas proporções de 1:10 ou 1:20 veneno:extrato (m:m) e em seguida a mistura foi adicionada ao plasma humano e a coagulação monitorada como descrito acima. (2) As doses de 22,5 µg e 45 µg de extratos (equivalentes as concentrações utilizadas nas proporções de 1:10 e 1:20, respectivamente), e o veneno (4,5 µg), foram adicionados sem pré-incubação ao plasma e a coagulação monitorada visualmente; (3) extratos aquosos nas doses baseadas na utilização popular (48,3, 145 ou 289,8 mg/kg), veneno (4,5 µg), ou o soro antibotrópico (100 µL) foram adicionados concomitantemente ao plasma. 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.

#### **2.4.3. Atividade desfibrinante**

Para a avaliação da atividade desfibrinante do veneno de *Bothrops atrox* foi empregado o método descrito por Gené et al. (1989). Para avaliar o efeito bloqueador dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* frente a atividade desfibrinante do veneno de *B.*

*atrox*, foram utilizados os seguintes grupos de tratamentos: 1) Grupo controle positivo: VBa (10 µg), foi administrado nos animais por via plexo venoso oftálmico (v.i.); 2) Grupo teste 1: administração por via oral de 289,8 mg/kg de EABd-MAO, imediatamente após injeção de VBa; 3) Grupo teste 2: administração por via oral de 289,8 mg/kg de EABd-STM, imediatamente após injeção de VBa; 4) Grupo padrão-ouro: administração de soro antibiótico via plexo venoso oftálmico (100 µL), imediatamente após injeção de VBa. 5) Grupo controle negativo: animais que receberam apenas água (via oral). Uma hora após administração dos tratamentos, foram coletadas amostras de sangue dos animais e mantidos à 37 °C. Em seguida, foi observado o tempo, até uma hora, da coagulação sanguínea.

#### **2.4.4. Atividade edematogênica**

A atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox* foi realizada de acordo com o método descrito por Yamakawa et al. (1976). Para a indução do edema foi realizada injeção intramuscular na pata traseira de camundongos de 5 µg de VBa, correspondente a duas vezes a Dose Mínima Edematogênica-DME, conforme padronizada no trabalho de Moura et al., 2014, para este pool de veneno. Para avaliar o potencial de bloqueio dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* (EABd-MAO e EABd-STM), frente a atividade edematogênica do VBa, foram utilizados os seguintes grupos de tratamentos: (1) Controle positivo: veneno de *B. atrox* (2DME, via subcutânea); (2) Grupo teste 1: EABd - MAO (289,8 mg/kg), via oral imediatamente após injeção do veneno; (3) Grupo teste 2: EABd - STM (289,8 mg/kg), via oral imediatamente após injeção do veneno; (4) Padrão ouro: SAB via plexo venoso oftálmico (100 µL), após injeção do veneno; A pata esquerda contralateral de cada animal recebeu igual volume de solução salina estéril (controle negativo). O volume da pata foi medido com uso de pletismômetro digital (EFF 304, Plethysmometer Paw) imediatamente após a administração do VBa (tempo zero), e nos tempos 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 24 horas. O edema foi expresso em mL pela diferença entre o volume da pata no tempo zero e nos demais tempos.

#### **2.4.5. Atividade gelatinolítica/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 na concentração de 12,5% e o de empacotamento, 5%. 2 mg/mL de gelatina (Sigma), foi incorporada no momento do preparo do gel. Ao final da corrida, o gel

foi lavado com tampão (Tris-HCl 50 mM, Cloreto de Cálcio 5 mM e Triton X-100 2,5%), durante 30 minutos. Ao término da 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. Logo em seguida, foi corado com solução corante (Coomassie-Blue, Bio-Rad, R-250, CA, USA), por 120 minutos e levemente descorado por 30 minutos. A avaliação da atividade proteolítica ocorreu com o aparecimento de bandas transparentes que contrastou com o fundo azul do gel corado com Coomassie blue representando a atividade da amostra em estudo.

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

Para verificar o efeito da interação dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* com proteínas do veneno de *Bothrops atrox* foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). Para isso, inicialmente foi utilizado um gel de corrida na concentração de 12,5% e o de empacotamento, 5%. Neste processo, alíquotas de VBa e extratos (EABd-MAO e EABd-STM), foram incubados por 30 minutos a 37 °C na proporção de 1:10 veneno:extratos (m:m). Em seguida as alíquotas das amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos na presença do tampão de amostra (Tris HCl SDS pH 6,8, glicerol e azul de bromofenol), analisado sob condições não redutoras. Foram preparados dois géis, sendo um gel corado com Coomassie Brilhante Blue (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) e o outro 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 antitropical – 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 adicionado 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.

## **2.5. Citotoxicidade**

### **2.5.1. Cultura de célula**

A linhagem celular MRC-5 (fibroblasto humano) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil, e mantidas no meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS), penicillina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL). As células foram mantidas incubadas a 37 °C com atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.5.2. Ensaio de Citotoxicidade**

A citotoxicidade dos extratos (EABd-MAO e EABd-STM), foi avaliada pelo método de alamar blue segundo Nakayama et al. (1997). As células foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com os extratos nas concentrações de 7,81, 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL, durante um período de 72 horas. Como controle positivo de morte, foi avaliada a citotoxicidade da Doxorubicina (25 µg/mL) e controle negativo DMSO (0,2%). Após o período de tratamento foi adicionado 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1:20). Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado, que compreendeu 2 horas, foi realizada a leitura da fluorescência. A fluorescência foi medida utilizando um leitor de multiplacas a um comprimento de onda de excitação de 590 nm e um comprimento de onda de emissão entre 530 e 560 nm. A citotoxicidade foi expressa como a média de CI<sub>50</sub>, a concentração de extrato que reduziu o crescimento celular em 50% nas condições experimentais.

## **2.6. Ensaio de atividade antioxidante**

### **2.6.1. Método do sequestro radical livre DPPH**

A atividade antioxidante dos extratos (EABd-MAO e EABd-STM) foi avaliada pelo método do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), conforme metodologia descrita por Miliauskas et al., (2004), com modificações. Aliquotas de 50 µL dos extratos solubilizados em etanol 80% (v/v) foram adicionadas a 1.950 µL de uma solução etanólica de DPPH (60 µM), com absorbância inicial entre 0,6 e 0,7, à temperatura ambiente. Os extratos foram testados nas concentrações finais de 1, 2, 5, 10 e 20 µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para o controle (etanol) e para o trolox (Sigma<sup>®</sup>), utilizado como

padrão antioxidante para comparação dos resultados. As misturas reacionais foram agitadas, protegidas da luz e do oxigênio e a absorbância foi lida a 517 nm em espectrofotômetro (Quimis® - UV-VIS). Com o objetivo de definir o tempo necessário para a estabilização da reação dos extratos com o DPPH, a absorbância foi lida aos 5, 15, 30, 45 e aos 60 minutos de reação. A atividade de sequestro do radical DPPH foi expressa por meio do percentual de inibição (%I), onde Ac é a absorbância do controle e Am a absorbância da amostra, segundo a equação:  $\%I: (Ac - Am) / Ac \times 100$ , utilizando os valores de concentração da amostra versus o percentual de inibição, foi determinada a IC<sub>50</sub>, concentração mínima dos extratos capazes de reduzir 50% do radical DPPH, obtida por regressão linear. O ensaio foi realizado em triplicata.

### **2.6.2. Atividade antioxidante em cultura de células**

A produção intracelular de ROS foi detectada utilizando o composto permeando de células não fluorescentes diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína (DCF-DA), como descrito por Wolfe e Liu, 2007. As células MRC-5 foram semeadas a uma densidade de  $6 \times 10^4$  células/poço em microplaca de 96 poços em 100  $\mu$ L de meio de crescimento. Após 24 h, o meio de crescimento foi removido e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, uma solução a 10  $\mu$ M de DCFH-DA dissolvido em tampão de Hank (100  $\mu$ L) foi adicionado e incubou-se durante 30 min a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas com PBS (100  $\mu$ L), em seguida, as amostras de EABd- MAO e EABd - STM em diferentes concentrações (5, 10 e 20  $\mu$ g) foram adicionados. A fluorescência foi imediatamente medida a um comprimento de onda de excitação de 485 nm de comprimento de onda e de emissão de 520 nm durante 120 minutos a intervalos de 5 min. Os controles com/sem DCFH-DA foram preparados e submetidos a processos análogos. A quercetina, foi utilizada como controle positivo de atividade antioxidante.

### **2.7. Análise estatística**

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

### 3. Resultados

#### 3.1. Perfil fitoquímico dos extratos vegetais

Os perfis cromatográficos por CCD dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma*, estão representados na tabela 01. É possível observar que não houve diferença entre os constituintes fitoquímicos dos extratos de *Bellucia dichotoma* provenientes de Manaus - AM e Santarém - PA, Brasil.

**Tabela 1.**

Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma*. Onde: EABd - MAO (extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*- proveniente de Manaus - Amazonas), e EABd – STM (extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*- proveniente de Santarém – Pará).

Classes de substâncias	Extratos vegetais	
	EABd – MAO	EABd – STM
Ácidos graxos	-	-
Antraquinonas	-	-
Cumarinas simples	-	-
Cumarinas	-	-
Flavonoides totais	+	+
Terpenóides	-	-
Taninos condensados	+	+
Taninos hidrolisáveis	+	+
Alcaloides	-	-

+ (positivo); - (negativo)

#### 3.2. Ensaio colorimétrico

As concentrações de fenóis totais, taninos totais, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e flavonoides totais, nos dois extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* foram determinadas. Os resultados obtidos mostram que os taninos são o grupo de fenóis predominantes nos extratos aquosos quando comparados com o conteúdo de flavonoides totais. Alta concentração de taninos condensados foi determinada em ambos os extratos. No entanto, houve diferença significativa entre os conteúdos de fenóis totais, taninos totais e taninos hidrolisáveis dos extratos, os quais apresentaram maiores concentrações no EABd – MAO (Tabela 2).

**Tabela 2.**

Concentrações de fenóis totais, taninos totais, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e flavonoides totais dos extratos aquosos das cascas de *Bellucia dichotoma*. Onde: EABd - MAO (extrato aquoso proveniente de Manaus - AM); EABd - STM (extrato aquoso proveniente de Santarém -PA).

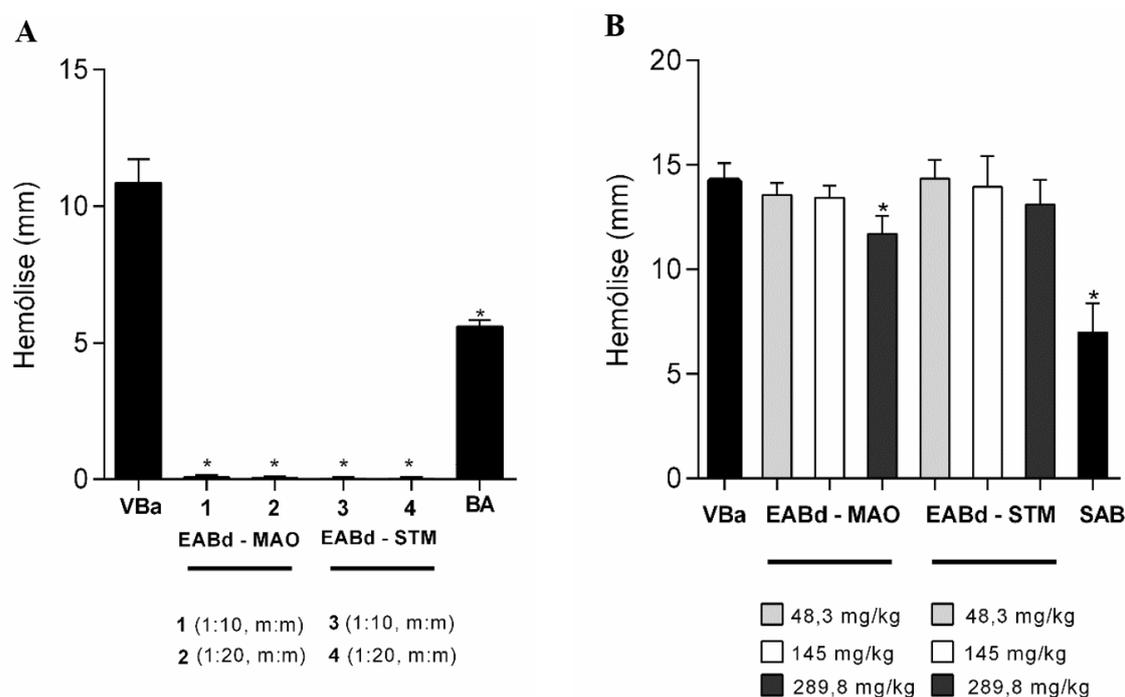
Amostras	Fenóis totais	Taninos totais	Taninos hidrolisáveis	Taninos condensados	Flavonoides totais
EABd – MAO	24,78 ± 0,11*	21,91 ± 1,06*	36,86 ± 0,65*	83,26 ± 0,74	0,08 ± 0,06
EABd – STM	14,97 ± 0,55*	10,29 ± 0,65*	28,50 ± 0,84*	84,37 ± 0,05	0,14 ± 0,05

Resultados expressos em g por 100 g de extrato, em base de peso seco. Média ± desvio padrão (n=3). \*diferença significativa entre os extratos EABd-MAO e EABd-STM. Tukey, n = 3/ por grupo

### 3.3. Ensaios de bloqueio das atividades induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*

#### 3.3.1. Inibição da atividade fosfolipásica

Os extratos EABd-MAO e EABd-STM, bloquearam 100% a atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops atrox*, quando utilizado o protocolo de pré-incubação (veneno:extrato), nas proporções de 1:10 ou 1:20 (Fig. 2A). O bloqueio observado foi mais eficaz do que o tratamento padrão (SAB), que reduziu 51,5% a atividade fosfolipásica causada pelo veneno. No entanto, quando os extratos vegetais EABd-MAO ou EABd-STM, foram 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 289,8 mg/kg ( $p = 0,02$ , quando comparado com o grupo controle positivo, VBa). Porém, não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos com os dois extratos em todas as concentrações avaliadas. O SAB incorporado ao gel reduziu 50,9% da atividade fosfolipásica do veneno (Fig. 2B).



**Fig. 2.** Potencial de bloqueio dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* frente à atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops atrox*. Onde: A) protocolo de pré-incubação nas proporções de 1:10 e 1:20 veneno:extratos (m:m). B) extratos e soro antibotrópico incorporados no momento do preparo do gel. AEBd-MAO (Manaus) e AEBd-STM (Santarém) ou BA (Soro antibotrópico). \*  $p < 0,05$  vs. Controle VBa (veneno de *Bothrops atrox*) e salina, teste de Tukey,  $n = 4/$  por grupo.

### 3.3.2. Inibição da atividade coagulante

A dose mínima coagulante (DMC) do veneno de *Bothrops atrox* foi de 2,25  $\mu\text{g}$  e, para os ensaios de bloqueio, foram utilizadas 2DMC. Os extratos aquosos AEBd - MAO, AEBd - STM ou soro antibotrópico, inibiram 100% a atividade coagulante do veneno de *B. atrox* quando utilizado o protocolo de pré-incubação (veneno:extratos, m:m) (Tabela 3). No protocolo utilizando as mesmas concentrações da pré-incubação (1:10 ou 1:20 m:m), porém aplicando as amostras concomitantemente, sem a utilização da pré-incubação das amostras com o veneno por 30 minutos à 37  $^{\circ}\text{C}$ , 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. O soro antibotrópico nas mesmas condições avaliada bloqueou 73,6% dessa atividade. Quando utilizado as doses conforme uso tradicional (48,3, 145 ou 289,8 mg/kg), o bloqueio da atividade coagulante do veneno de *B. atrox* foi de 100%, sem pré-incubação, tanto para os extratos aquosos de Manaus e Santarém, como para o soro antibotrópico.

**Tabela 3.**

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). Protocolos com e sem-pré-incubação utilizando as proporções 1:10 e 1:20 (veneno:extratos).

Amostras	Atividade coagulante (min)		
	Veneno (4,5 µg)	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*	> 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*

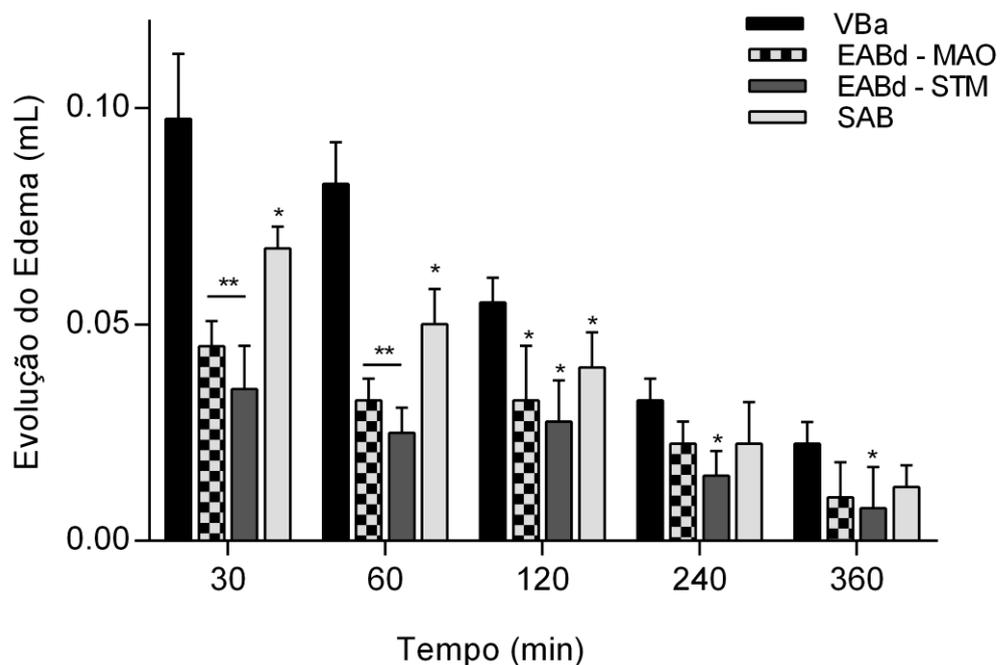
\*  $p < 0,05$  vs. Controle VBa (veneno de *Bothrops atrox*) e salina, teste de Tukey,  $n = 4/$  por grupo.

### 3.3.3. Inibição da atividade desfibrinante

Os extratos aquosos da casca de *Bellucia dichotoma* provenientes de Manaus - AM e Santarém - PA, não foram capazes de bloquear a atividade desfibrinante do veneno de *Bothrops atrox*. Por outro lado, o soro antibotrópico foi eficaz em neutralizar 96,1% da incoagulabilidade sanguínea induzida pelo veneno de *B. atrox*, durante os 60 minutos de observação.

### 3.3.4. Inibição da atividade edematogênica

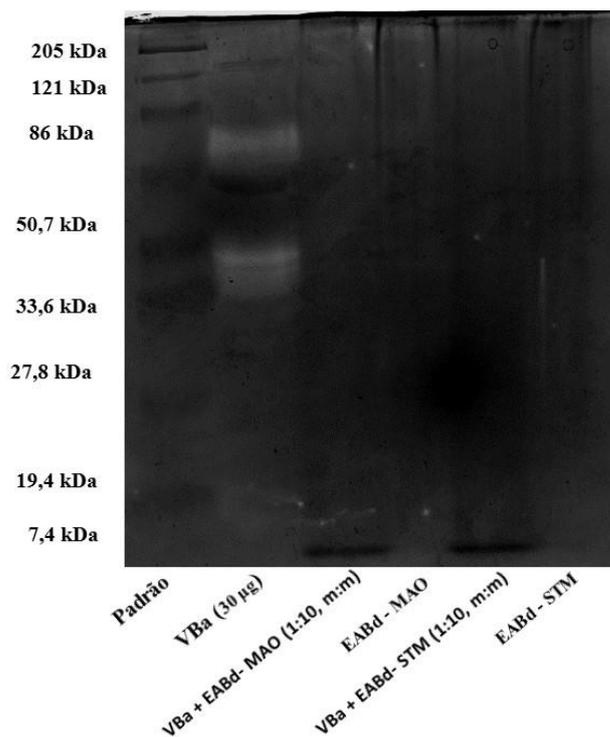
O edema induzido pelo veneno de *Bothrops atrox* teve ação muito rápida, atingindo o pico de atividade em 30 minutos. A atividade edematogênica foi inibida significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir dos 30 minutos de indução do edema, onde o tratamento com o EABd-MAO reduziu 56,7% em 30 minutos e 70,9 % na 6ª hora de tratamento, e o EABd-STM com redução de 63,3% e 78,6%, ambos sendo mais eficazes que o tratamento padrão (SAB) que reduziu 31,5% e 55,1%, respectivamente, no mesmo período observado. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com EABd-MAO e EABd-STM (Figura 3).



**Fig. 3:** Potencial de bloqueio dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* frente a atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*. Onde: VBa (veneno de *Bothrops atrox*); EABd-MAO (Extrato aquoso de *B. dichotoma* proveniente de Manaus); EABd-STM (Extrato aquoso de *B. dichotoma* proveniente de Santarém; SAB (Soro antitoxico). \* diferença significativa em relação ao grupo controle (VBa)  $p < 0,05$ . \*\* diferença significativa entre os tratamentos (EABd-MAO e EABd-STM) em relação ao grupo controle (VBa) e o tratamento padrão (SAB)  $< 0,05$ , teste de Tukey,  $n=4$ / por grupo.

### 3.3.5. Atividade gelatinolítica/zimografia

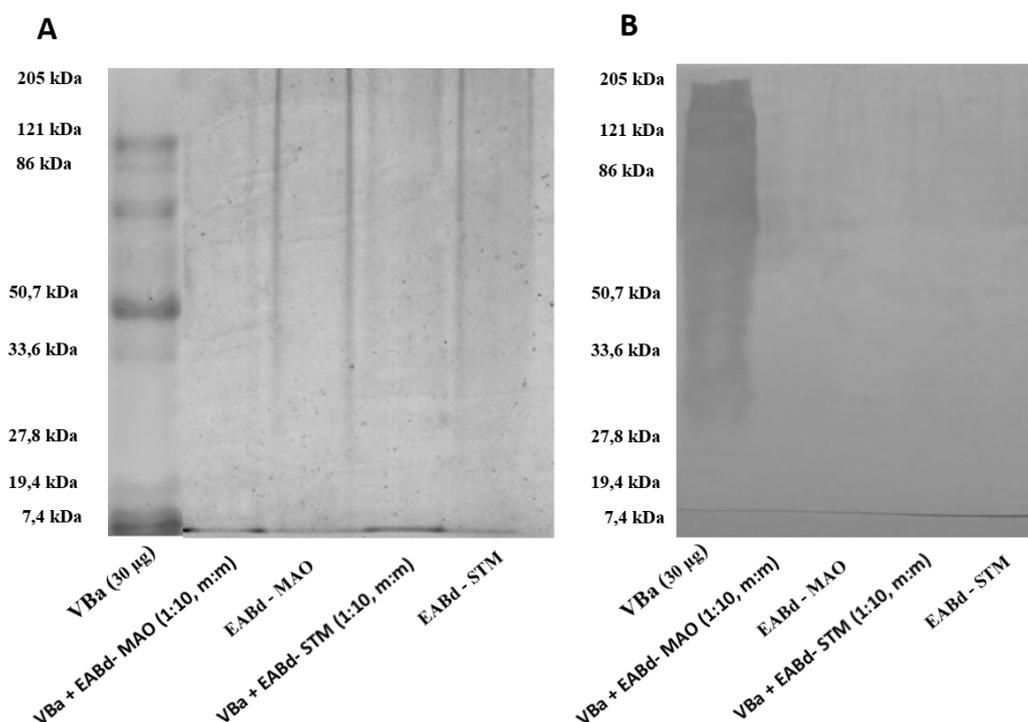
Na zimografia, o veneno de *Bothrops atrox* (30  $\mu\text{g}$ ) apresentou duas bandas com atividade gelatinolítica marcante, a primeira de aproximadamente 86 kDa, e a segunda entre 50, 7 e 33, 6 kDa. Nos perfis das misturas do veneno com os extratos vegetais EABd - MAO e EABd - STM (1:10, m:m), não foram detectadas nenhuma banda com atividade sobre a gelatina (Figura 4).



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

### 3.3.7. Eletroforese SDS/PAGE e Western blot

Os perfis das proteínas presentes no veneno de *Bothrops atrox* e na mistura de veneno com os extratos aquosos EABd - MAO ou EABd - STM, estão representados na figura 5. Quando comparado o perfil do veneno de *B. atrox* com as amostras pré-incubadas de veneno + EABd -MAO ou EABd - STM, 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 (Fig. 5 A e B).



**Fig. 5.** Interação entre os extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* e veneno de *Bothrops atrox*. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e B) *Western blot*. VBa (Veneno de *Bothrops atrox*); EABd - MAO (extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* proveniente de Manaus - AM); EABd - STM (extrato aquoso de *B. dichotoma* proveniente de Santarém - PA).

### 3.4. Citotoxicidade

Os extratos aquosos das cascas de *Bellucia dichotoma* proveniente de Manaus - AM ou de Santarém - PA não apresentaram efeito citotóxico em células de fibroblastos humanos da linhagem MRC-5, as  $CI_{50}$  (Concentração de inibição) foram de 193,8 (127,4 - 294,7) e 183,7 (154,6 - 218,3) respectivamente. Não houve diferença significativa entre os dois extratos. A viabilidade celular foi de 80,5% (EABd - STM) e de 89,8% (EABd - MAO), na maior concentração avaliada de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Viabilidade foi superior ao controle positivo (Doxorrubicina) que apresentou 20,6% na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ .

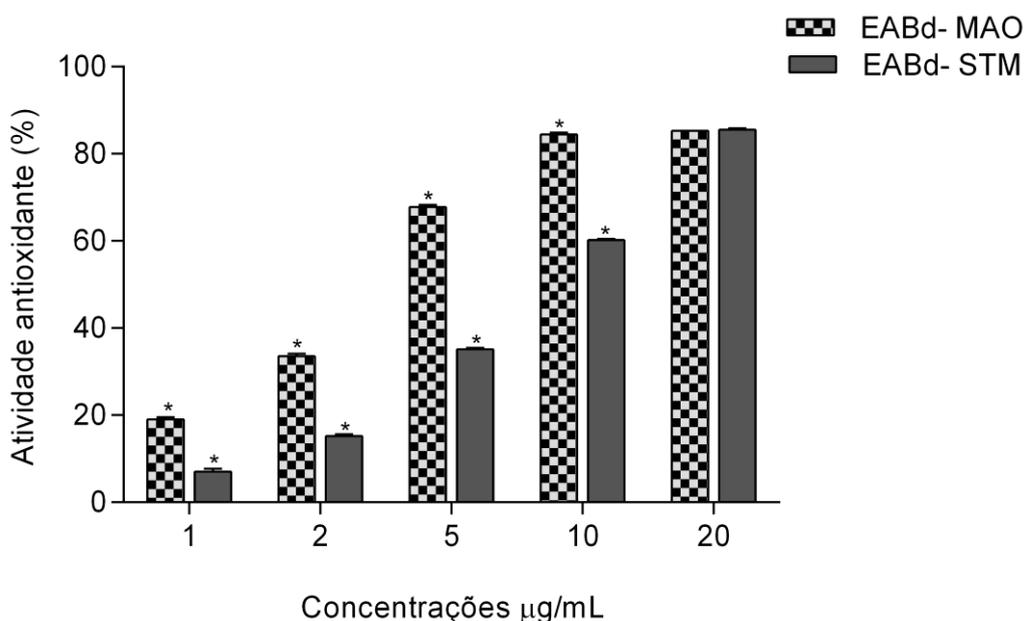
### 3.5. Ensaios atividade antioxidante

#### 3.5.1. Método do sequestro radical livre DPPH

Os estudos de tempo de reação dos extratos aquosos de Manaus e Santarém com o radical livre DPPH mostraram estabilidade de reação aos 30 minutos. A inibição máxima do

DPPH foi similar para os dois extratos (EABd-MAO - 85,53%; EABd-STM - 85,32%), na mesma concentração de 20 µg/mL e superiores ao do trolox que foi de 68,21% na maior concentração testada (5 µg/mL). No entanto, em concentrações menores (1, 2, 5 e 10 µg/mL), o EABd- MAO apresentou potencial antioxidante superior ao EABd- STM (Figura 6).

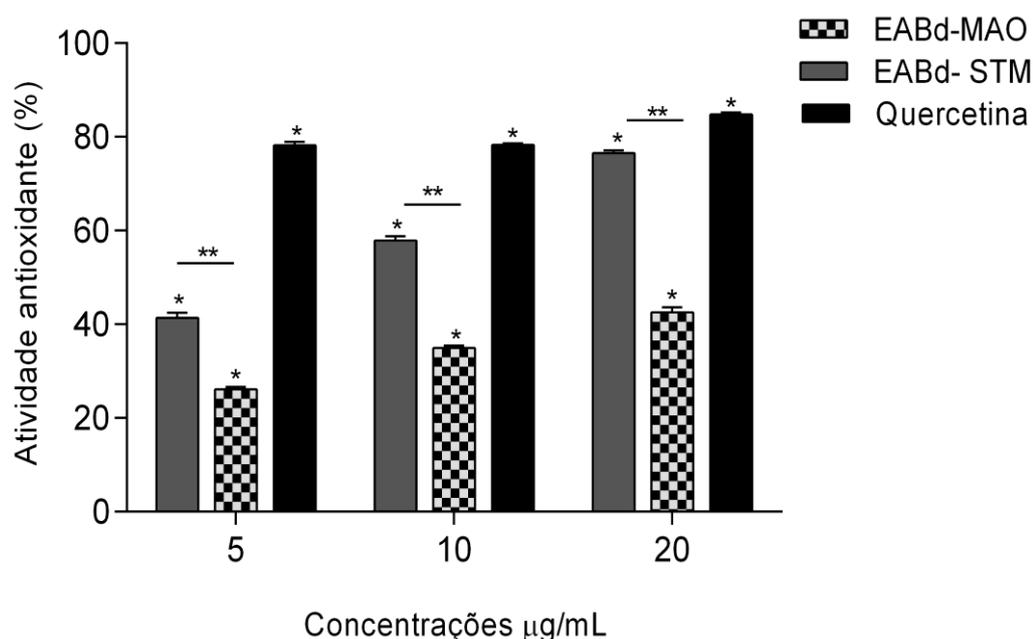
A concentração do EABd-MAO capaz de reduzir em 50% o radical livre DPPH foi de  $3,50 \pm 0,04$  µg/mL, e a do EABd-STM foi de  $8,03 \pm 0,04$  µg/mL.



**Fig.6.** Capacidade antioxidante dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* pelo método de sequestro do radical livre DPPH. Onde: EABd-MAO (Extrato aquoso de *B. dichotoma* proveniente de Manaus); EABd-STM (Extrato aquoso de *B. dichotoma* proveniente de Santarém). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3). \*diferença significativa entre EABd - MAO e EABd - STM.

### 3.5.2. Antioxidante em cultura de células

O extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* proveniente de Santarém (EABd - STM), apresentou elevada atividade antioxidante, em todas as concentrações testadas, sendo a inibição máxima de 76,8% da oxidação do DCFH-DA, obtida na concentração de 20 µg/mL, no período de observação de 120 minutos. Esse potencial de inibição foi próximo ao da quercetina (85,2%), e mais eficaz que o EABd - MAO que inibiu 41,5% na mesma concentração utilizada (Figura 7).



**Fig. 7.** Avaliação da atividade antioxidante na linhagem celular MRC-5 (fibroblasto humano). Onde: EABd-MAO (Extrato aquoso de *B. dichotoma* proveniente de Manaus); EABd-STM (Extrato aquoso de *B. dichotoma* proveniente de Santarém). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3). \*diferença significativa entre as amostras (EABd - MAO; EABd - STM e Quercetina); \*\* diferença significativa entre EABd - MAO e EABd - STM.

#### 4. Discussão

As cascas de *Bellucia dichotoma* Cogn., conhecida popularmente como *muúba* ou *goiaba-de-anta*, são utilizadas com fins medicinais em Santarém-PA (Renner, 1989), principalmente para tratar envenenamentos ofídicos (Moura et al., 2015). O extrato aquoso da casca (chá por decocção) de *B. dichotoma*, quando testado pela primeira vez em protocolos que simulavam uso tradicional, ou seja, extrato aquoso por via oral, foi capaz de reduzir o edema significativamente a partir dos 30 minutos em todas as doses avaliadas. A inibição foi ainda maior, quando o extrato (via oral) e soro antibotrópico (i.v) foram administrados concomitantemente, sendo este tratamento mais eficaz do que o preconizado, pelo Ministério da Saúde, somente com o antiveneno padrão (Moura et al., 2014). No presente estudo, estendemos a avaliação do extrato aquoso de *B. dichotoma* frente as atividades: desfibrinante (extratos por via oral), coagulante (sem pré-incubação), antioxidante e a citotóxica. Além de comparar os potenciais bloqueadores de espécimes coletados em diferentes localidades geográficas (Santarém - Pará e Manaus - Amazonas, Brasil).

A produção de metabólitos secundários nas plantas de uma mesma espécie pode variar com alterações sazonais, circadianas, temperatura, altitude, índice pluviométrico, radiação

UV, disponibilidade de nutrientes e água no solo (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Em relação às condições ambientais tais como temperatura, umidade e pluviosidade para o período de coleta de *Bellucia dichotoma*, os dois ambientes (Manaus- Amazonas e Santarém- Pará), podem ser considerados similares. Nossos resultados mostram que não houve diferença entre os perfis fitoquímicos dos dois espécimes de *Bellucia dichotoma* coletados nesses locais distintos. As classes de metabolitos detectadas em ambos os extratos aquosos, foram flavonoides totais, taninos hidrolisáveis e condensados, e esses resultados foram similares aos obtidos por Moura et al., 2013. O teor dos compostos fenólicos (taninos condensados, taninos hidrolisáveis e de flavonoides) foram determinados por ensaios colorimétricos pela primeira vez no extrato aquoso de *B. dichotoma* proveniente de Santarém (Moura et al., 2014), apresentando alto teor de taninos condensados. No presente estudo, nos extratos aquosos também foram obtidas grandes concentrações de taninos, principalmente de taninos condensados (EABd – MAO -  $83,26 \pm 0,74$ ; EABd - STM -  $84,37 \pm 0,05$ ). No entanto, houve diferença significativa entre os conteúdos de fenóis totais, taninos totais e taninos hidrolisáveis dos extratos, os quais foram mais concentrados no EABd - MAO. Porém, as diferenças no teor dos compostos fenólicos não influenciaram no potencial de bloqueio dos extratos frente as atividades testadas do veneno de *Bothrops atrox*.

O veneno de *Bothrops* sp. induz uma intensa atividade coagulante (in vitro), que ocorre tanto devido a clivagem direta do fibrinogênio pelos componentes trombina-símiles do veneno, como pela formação de trombina intravascular pelos componentes pró-coagulantes dos venenos botrópicos (Sano-Martins et al., 1995). Além disso, o veneno botrópico pode causar o prolongamento do tempo de coagulação (incoagulabilidade do sangue), devido a um consumo gradativo e contínuo de alguns fatores da coagulação, especialmente o fibrinogênio, que é hidrolisado em fibrina intravascular, e pela ativação da fibrinólise, essa é rapidamente transformada em produtos de degradação da fibrina (PDF) (Milani et al., 1997; Sano Martins e Santoro, 2009), prolongando o tempo de coagulação do sangue. No presente estudo, avaliamos o potencial dos extratos de *Bellucia dichotoma* em bloquear a atividade coagulante (in vitro), e in vivo (desfibrinante). Em relação a atividade coagulante in vitro do veneno de *B. atrox*, ambos extratos bloquearam 100% essa atividade, quando utilizamos o protocolo de pré-incubação dos extratos com o veneno. No entanto, ao avaliarmos pela primeira vez, o potencial de bloqueio com as mesmas concentrações, 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, não apresentando diferença significativa nos potenciais de inibição, porém, o antibotrópico bloqueou 73,6% da atividade coagulante nas

mesmas condições avaliadas. No entanto, quando utilizamos o protocolo sem pré-incubação mas com as concentrações usadas pela população (48,3, 145 e 289,8 mg/kg), houve bloqueio de 100% da atividade coagulante para ambos extratos. Porém, quando testados para a atividade desfibrinante (in vivo) do veneno de *B. atrox*, não houve inibição significativa para ambos extratos (tempo de observação de 60 minutos), mas o soro antitoxico foi eficaz em neutralizar 96,1%, dessa atividade.

As PLA<sub>2</sub> são uma das classes de enzimas, cálcio-dependentes, correspondem a 3,3% da composição total do veneno de *Bothrops atrox* (Sousa et al., 2013) e exibem uma grande variabilidade de efeitos farmacológicos por mecanismos que podem ser dependentes ou independentes de sua atividade enzimática, como, miotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hemólise, hemorragia, hipotensão, anticoagulação, indução de edema e danos em tecidos (Kini, 2003; Lomonte et al., 2003). No presente trabalho verificamos que os extratos aquosos de Manaus e Santarém bloquearam 100% a atividade PLA<sub>2</sub> do veneno, utilizando protocolo de pré-incubação. Porém quando esses extratos foram aplicados diretamente ao gel de agarose 1% (sem pré-incubação), não bloquearam significativamente a atividade fosfolipásica do veneno, resultados semelhantes ao estudo de Moura et al., 2014.

O bloqueio total das atividades coagulantes e fosfolipásica de VBa, pelos extratos de *Bellucia dichotoma*, na pré-incubação, provavelmente seja devido ao alto teor de taninos presentes em ambos extratos. Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico e possuem a capacidade de quelar íons metais, podendo precipitar proteínas e formar complexos com metais como Zn<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> (Castro et al., 1999; Mello e Santos, 2001). São conhecidos pela sua capacidade de bloquear diversas atividades biológicas induzidas pelos venenos de serpentes, principalmente atividade hemorrágica, hemolítica e coagulante, as quais são induzidas por componentes que dependem de íons ou em suas estruturas ou como cofatores para exercerem suas ações (Pithayanukul et al., 2009; Ambikabothly et al., 2011; Nanjaraj Urs et al., 2015). Por exemplo, formam complexos com o zinco presente em sítios ativos de metaloproteínas hemorrágicas de venenos de serpentes, tornando-as inativas (Castro et al., 1999) ou quelam o cálcio, que é um cofator para atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> e para várias etapas da cascata de coagulação (Patiño et al., 2012). Isso foi observado nos experimentos de pré-incubação do veneno com os extratos, nos quais foram obtidos bloqueios de 100% para as atividades fosfolipásica e coagulante. Resultado semelhante foram observados por Moura et al., 2014 com o extrato aquoso de *B. dichotoma*, e com os taninos condensados purificados do extrato aquoso de *Plathymentia reticulata*, que foram capazes de bloquear 100% as atividades coagulante e fosfolipásica do veneno de *B.*

*atrox* no método de pré-incubação (Moura et al., 2016). Na tentativa de evitar a ação quelante dos extratos, realizamos experimentos sem a pré-incubação. Quando foram utilizadas as doses conforme uso tradicional houve também bloqueio de 100% na atividade coagulante, porém, não podemos descartar que essa atividade bloqueadora seja causada pela presença de compostos fenólicos nos extratos.

Os perfis obtidos com o veneno, o extrato de *Bellucia dichotoma* e a mistura dos extratos com veneno de *B. atrox* em eletroforese por SDS-PAGE (Fig.5A) seguido de *Western blot* (Fig. 5B), reforçam fortemente a ação quelante dos componentes presentes nos extratos de *Bellucia dichotoma*, como taninos e flavonoides. O desaparecimento de algumas bandas do veneno, observado após a pré-incubação com os extratos, seja provavelmente devido à formação de complexos com alta massa molecular, pela ação dos componentes quelantes, e esses complexos não foram capazes de penetrar no gel, na concentração usada. Quando utilizado a zimografia ficou evidente a ação gelatinolítica do veneno de *Bothrops atrox* com o surgimento de duas bandas de enzimas, as quais clivaram a gelatina, usada como substrato incorporado ao gel (Fig. 4). No entanto, essa atividade não foi detectada no veneno pré-incubado com os extratos, indicando um bloqueio dos extratos sobre a atividade proteolítica induzida pelo veneno de *B. atrox*, novamente, provavelmente devido a ação dos taninos. Assim, para a comprovação da atividade antiofídica de extratos vegetais os testes devem ser realizados *in vivo*, de acordo com o uso tradicional, visto que os resultados obtidos em experimentos *in vitro* podem ser superestimados, devido a ação quelante dos componentes presentes nos extratos.

Na lesão local causada por serpentes do gênero *Bothrops* pode ocorrer formação de radicais livres e o estresse oxidativo agravando ainda mais o quadro (Cardoso et al., 2003). Assim, os extratos aquosos (EABd - MAO e EABd - STM), foram testados quanto as suas capacidades antioxidantes, o extrato oriundo de Manaus apresentou maior potencial no método de sequestro radical livre DPPH, provavelmente devido a ação dos compostos fenólicos (fenóis totais, taninos totais), que foram mais concentrados nesse extrato. No entanto, quando a atividade antioxidante foi testada em células, o extrato proveniente de Santarém foi mais eficaz, provavelmente por uma ação dos flavonoides presentes em maior concentração nesse extrato. Porém, os dois extratos apresentaram alta capacidade antioxidante. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Da Silva et., 2016, onde a espécie antiofídica *Connarus favosus*, apresentou potencial antioxidante, possivelmente devido aos taninos e flavonoides presentes em sua composição química. Os flavonoides e taninos são compostos com uma vasta gama de bioatividades (Shohaib et al., 2011; Schofield

et al., 2001), incluindo a atividade antioxidante, que é parcialmente explicada por suas capacidades de quelar metais indutores de atividades oxidantes, tais como ferro e cobre. Esses compostos fenólicos podem ainda estabilizar radicais livres dependendo de sua estrutura química (Justino et al., 2006; Perron e Brumaghim, 2009).

O veneno de *Bothrops atrox* induz reação inflamatória aguda significativa no local de sua injeção, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e do influxo leucocitário. As células migratórias são representadas por monócitos (transformados em macrófagos) e neutrófilos, que se acumulam desde os períodos precoces da ação do veneno (Moreira et al., 2012). Os extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* (EABd - MAO e EABd - STM), preparados de acordo com uso tradicional, apresentaram uma importante atividade bloqueadora do edema de *B. atrox*. O potencial máximo de redução foi de 70,9 % (EABd-MAO) e 78,6% (EABd- STM), na 6ª hora de tratamento, ambos sendo mais eficazes que o tratamento padrão, antibotrópico, que reduziu apenas 55,1%, no mesmo período observado. Não foi observada diferença significativa entre os extratos aquosos de Manaus e de Santarém, portanto, o local de coleta não influenciou seus potenciais de bloqueio frente ao edema. Resultado muito promissor, visto que o edema pode levar a síndrome compartimental (nas primeiras 24 horas), acarretando muitas vezes em amputação ou déficit funcional do membro acometido (França e Málaque, 2009). A complexidade de componentes do veneno, de mediadores inflamatórios e de mecanismos que participam induzindo os efeitos locais, representa um obstáculo importante para abordagem terapêutica (Gutiérrez e Lomonte, 2009; Moreira et al., 2013; 2016). Assim sendo, os extratos vegetais que agem bloqueando o edema podem ser importantes aliados à soroterapia, pois os antivenenos botrópicos são pouco eficazes na neutralização dos efeitos locais induzidos no envenenamento.

Vale ressaltar que os extratos aquosos de *B. dichotoma* não apresentaram ação tóxica frente a células normais (fibroblastos humanos da linhagem MRC-5). No entanto, estudos complementares de toxicidade crônica, in vivo, devem ser realizados, para que o extrato possa ser utilizado com segurança pela população, visto que sua utilização é frequente, (Moura et al., 2014, 2015), e a espécie é bastante promissora para agricultura familiar e agroecológica na Amazônia (Kinupp, 2014).

## 5. Conclusão

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. Apesar dos conteúdos de compostos fenólicos presentes nos extratos terem sido diferentes, não houve diferença significativa entre o potencial antiofídico apresentado pelos dois espécimes de *Bellucia dichotoma* coletados em Manaus - AM e Santarém - PA, nas concentrações de extratos avaliadas. Os extratos apresentaram um alto potencial antioxidante e não foram considerados tóxicos. O potencial inibitório semelhante dos extratos, fornece subsídios importantes para o controle de qualidade da matéria prima e a padronização de fitoterápicos que envolvem várias etapas. A origem e a qualidade das matérias-primas têm um papel central na obtenção de produtos que mantenham sua composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis constantes. Após estudos preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil, *Bellucia dichotoma* poderá ser utilizada para produção de um fitoterápico como tratamento complementar para as ações locais, frequentes nos acidentes com espécies do gênero *Bothrop* sp.

## **6. Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela bolsa de iniciação científica da Luana Yamille Andrade de Souza, e a bolsa de doutorado da Valéria Mourão de Moura (no. 151279/2012-8). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTOX) pelo suporte financeiro (ref. no. 573790/2008-6/CNPq, 1217/2011/CAPES). Pela bolsa de produtividade concedida pelo CNPq (no. 303786/2013-2) para Maria Cristina dos Santos, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM). Ao MSc. Hipócrates de Menezes Chalkidis, pela coleta das espécies de *Bothrops atrox* e extração do pool de veneno utilizado neste estudo. Ao Engenheiro Florestal MSc. Fábio Guerra Santos, pela elaboração do mapa de localização da coleta dos espécimes vegetais. E especialmente, aos moradores das comunidades de São Pedro, Cucurunã, Alter do Chão e Santarém-PA, por compartilhar o conhecimento popular.

## 7. Referências bibliográficas

- Ambikabothu, J., Ibrahim, H., Ambu, S., Chakravarthi, S., Awang, K., Vejayan, J., 2011. Efficacy evaluations of mimosa pudica tannin isolate (MPT) for its anti-ophidian properties. *J. Ethnopharmacol.* 137, 257–262.
- Assakura, M. T., Furtado, M. F., Mandelbaum, F. R., 1992. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry.* 102, 727-732.
- Baumgratz, J. F. A. 2013. Lista de espécies da flora do Brasil: *Bellucia dichotoma*. <http://www.reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23691>. Acesso em Setembro, 2014.
- Bustillo, S., García-Denegri, M.E., Gay, C., Van De Velde, A.C., Acosta, O., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Leiva, L., 2015. Phospholipase A<sub>2</sub> enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. *Chem. Biol. Interact.* 240, 30–36.
- 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.
- Cardoso, J. L. C., 2009. A fitoterapia antiveneno na medicina brasileira, in: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, 2. ed. Sarvier, São Paulo, pp. 481-485.
- 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. *Rev. Biol. Trop.* 47, 605–616.
- França, F. O. S., Málaque, C. M. S., 2009. Acidente botrópico, in: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*, 2. ed. Sarvier, São Paulo, pp. 81-95.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, 374-381.

- Gené, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. 1989. Comparative study on coagulant, desfibrinating, fibrinolytic and fibrogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27, 841-848.
- Gutiérrez, J. M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 26, 411-413.
- Gutiérrez, J. M., 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*. 50, 377-394.
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., 2013. Phospholipases A<sub>2</sub>: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon*. 62, 27-39.
- Justino, G.C.; Correia, C.F.; Mira, L.; Borges Dos Santos, R.M.; Martinho Simões, J.A.; Silva, A.M., Santos, C., Gigante, B., 2006. Antioxidant activity of a catechol derived from abietic acid. *J. Agric. Food Chem* 54, 342–348.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Santamaría, A., 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.
- Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon* 42, 827–840.
- Kinupp, V. F., Lorenzi, H., 2014. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. 1 ed. Plantarum, pp. 514-515.
- Mello, J. C.P., Santos, S. C. 2001. Taninos. In: Simões, C.M., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFGRS/Ed.UFSC, cap. 24, p.517-543
- Marini-Bettòlo, G. B., Nicoletti, M., Patamia, M., Galeffi, C., Messina, I., 1981. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. *Journal of Chromatography A*. 213, 113-127.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., van Beek, T. A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85, 231-237.

- Mole, S., Waterman, P.G., 1987. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. *Oecologia (Berl.)* 72, 137–156.
- Monteiro-Dos-Santos, J., Conceição, K., Seibert, C. S., Marques, E. E., Ismael Silva Jr, P., Soares, A. B., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., 2011. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. henlei*. *International Immunopharmacology*. 11, 1368-1377.
- Moreira, V., Dos-Santos, M.C., Nascimento, N.G., Silva, H.B., Fernandes, C.M., D'Império Lima, M.R., Teixeira, C., 2012. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom. *Toxicon* 60, 12–20.
- Moreira, V. T., C., Silva, H.B., D'Império Lima, M.R., Dos-Santos, M.C., 2013. The crucial role of the MyD88 adaptor protein in the inflammatory response induced by *Bothrops atrox* venom. *Toxicon* 67, 37–46.
- Moreira, V. T., D'Império Lima, C., Da Silva, M.R., Borges, H., Dos-Santos, M. C., 2016. The role of TLR2 in the acute inflammatory response induced by *Bothrops atrox* snake venom. *Toxicon* 118, 121-128.
- Mors, W. B., Nascimento, M. C., Pereira, B. M. R., Pereira, N. A., 2000. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. *Phytochemistry*. 55, 627-642.
- Moura-Da-Silva, A. M., Butera, D., Tanjoni, I., 2007. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. *Current Pharmaceutical Design*. 13, 2893-2905.
- Moura, V. M., Sousa, L. a. F., Oliveira, R. B., Silva, A. M. M., Chalkidis, H. M., Silva, M. N., Pacheco, S., Moura, 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 Plants Research*. 7, 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.
- Moura, V.M., Freitas-de-Sousa, L.A., Dos-Santos, M.C., Raposo, J.D.A., Lima, A.E., Oliveira, R.B., Silva, M.N., Mourão, R.H.V., 2015. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: an assessment of their effectiveness in inhibiting

- hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. J. Ethnopharmacol. 161, 224–232.
- Moura, V.M., 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. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. J. Ethnopharmacol. 183, 136-142.
- Nakayama, G.R., Caton, M.C., Nova, M.P., Parandoosh, Z., 1997. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. J. Immunol. Methods, 204, 205–208.
- Nanjaraj Urs, A.N., Yariswamy, M., Ramakrishnan, C., Joshi, V., Suvilesh, K.N., Savitha, M.N., Velmurugan, D., Vishwanath, B.S., 2015. Inhibitory potential of three zinc chelating agents against the proteolytic, hemorrhagic, and myotoxic activities of *Echis carinatus* venom. Toxicon 93, 68-78.
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S. L., Osorio, R. G., Saldarriaga, M., Díaz, A., 2000. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. Journal of Ethnopharmacology. 73, 233-241.
- Patiño, A.C., López, J., Aristizábal, M., Quintana, J.C., 2012. Evaluation of the inhibitory effect of extracts from leaves of *Renalmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) on the venom of *Bothrops asper* (mapaná). Biomédica 32, 365–374.
- Perron, N.R.; Brumaghim, J.L., 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. Cell Biochem. Biophys 53, 75–100. 26.
- Pithayanukul, P., Leanpolchareanchai, J., Saparpakorn, P., 2009. Molecular Docking Studies and Anti-Snake Venom Metalloproteinase Activity of Thai Mango Seed Kernel Extract. Molecules 14, 3198-3213.
- Renner, S. S., Memoirs of the New York Botanical Garden. 1989. Systematic Studies in the Melastomataceae: *Bellucia*, *Loreya* and *Macairea*. The New York Botanical Garden, vol. 50, p.56 (pp. 12).
- Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. Animal Feed Science and Technology 91, 21-40.
- Serrano, S. M. T., Maroun, R. C., 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. Toxicon. 45, 1115-1132.
- Shohaib.T, M., Shafique, D. N., Madhu, C.D., 2011. Importance of flavonoids in therapeutics, Hygeia journal for drugs and medicines 1, 1-18.

- Sousa, L.F., Nicolau, C.A., Peixoto, P.S., Bernardoni, J.L., Oliveira, S.S., Portes-Junior, A. P., Mourão, R.H.V., Lima-dos-Santos, I., Sano-Martin, I.S., Chalkidis, H.M., Valente, R.H., Moura-da-Silva, A.M., 2013. Comparison of phylogeny, Venom composition and neutralization by Antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e2442.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I., 1998. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. J. Agric. Food Chem. 46, 4267–4274.
- Theakston, R.D.G., Reid, H.A., 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bull. World Health Organ. 61, 949–956.
- Vanhaelen, M., Lejoly, J., Hanocq, M., Molle, L., 1991. Climatic and geographical aspects of medicinal plant constituents, in: Wijesekere, R. O. B. (Ed.), The Medicinal Plant Industry, CRC Press, Boca Raton, pp. 59-84.
- Vilar, J.C., Carvalho, C.M., Furtado, M.F.D., 2005. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas. Biologia geral e Experimental 6, 3-36.
- Warrell, D. A., 2004. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management, in: Campbell, J. A., Lamar, W. W., Brodie, E. D. (Eds.), The venomous reptiles of the Western Hemisphere, 1. ed. Comstock Publishing Associates Ithaca, New York, pp. 709-761.
- Willis, R.B., Allen, P.R., 1998. Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. Analyst 123, 435–439.
- Yamakawa, S.A., Nozaki, M., Hokawa, Z., 1976. Fractionation of Sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. Animal, Plant and Microbial Toxins 1. Plenum, New York, p. 555 (pp. 97–109).

## CAPÍTULO IV

Artigo escrito de acordo com as normas da revista *Toxicon* (ISSN 0041-0101), o qual deverá ser submetido após finalização e tradução para língua inglesa<sup>3</sup>.

### **Desenvolvimento de um método por HPLC-DAD para isolamento dos constituintes do extrato de *Bellucia dichotoma* cogn. (Melastomataceae): correlação com potencial antiofídico da espécie**

Valéria Mourão de Moura<sup>a\*</sup>, Sonia das Graças Santa Rosa Pamplona<sup>b</sup>, Geysel do Carmo Diniz Sampaio<sup>b</sup>, Rosa Helena Veras Mourão<sup>c</sup>, Maria Cristina Dos-Santos<sup>a</sup>, Milton Nascimento da Silva<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>*Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas- UFAM, Av. Rodrigo Octávio Ramos, 3000, Manaus, AM, Brasil.*

<sup>d</sup>*Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará – UFPA, Rua Augusto Corrêa, 66075-110, Belém, PA, Brasil.*

<sup>c</sup>*Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Rua Vera Paz, s/n, 68035-110, Santarém, PA, Brasil.*

#### **Resumo**

Neste trabalho relatou-se a contribuição química ao estudo antiofídico de *B. dichotoma* a partir do desenvolvimento de um método por HPLC-DAD para isolamento dos constituintes majoritários do extrato aquoso das cascas de *B. dichotoma*. Para o isolamento dos constituintes do extrato aquoso foi desenvolvido um método por HPLC-DAD. A elucidação estrutural das substâncias isoladas está sendo realizada por análises dos espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais. A eficácia dos compostos isolados no bloqueio da atividade hemorrágica e fosfolipásica A<sub>2</sub> foi avaliada, inicialmente pelo protocolo de pré-incubação na proporção de 1:1 (veneno:compostos, m:m); e posteriormente, será avaliada em protocolos onde os compostos serão administrados por via oral (atividade hemorrágica) ou de

---

<sup>3</sup> Este trabalho está sendo realizado em parceria com o Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-LABCROL, coordenado pelo Doutor Milton Nascimento da Silva da Universidade Federal do Pará- UFPA

incorporação na agarose dos compostos (atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>). O potencial de bloqueio frente à atividade coagulante induzida pelo veneno de *B. atrox* será avaliado com ou sem pré-incubação. A interação dos compostos isolados do extrato com proteínas do veneno será verificada por eletroforese SDS-PAGE e *Western blot*. A partir do método desenvolvido foi possível obter 3 compostos isolados da fração FBd1. O composto CBd1 bloqueou totalmente a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox*, no protocolo de pré-incubação. No entanto, será necessário aperfeiçoamento do método e novas análises por RMN e espectromômetro de massas, a fim de elucidar a estrutura do composto. A realização desse estudo poderá contribuir para possível correlação com o potencial antiofídico da espécie *Bellucia dichotoma*.

## 1. Introdução

*Bellucia dichotoma* Cogn. conhecida popularmente como muúba ou goiaba-de-anta é uma das muitas espécies pertencentes à família Melastomataceae. Esta família é constituída por aproximadamente 166 gêneros e cerca de 4.570 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais (Romero e Martins, 2002). No Brasil Melastomataceae é a sexta maior família de Angiosperma, sendo encontrada do Amazonas ao Rio Grande do Sul, presente em praticamente todas as formas de vegetação (Romero e Martins, 2002).

Essa família tem sido pouco estudada do ponto de vista fitoquímico e quimiotaxonômico. Embora um grande número de compostos tenha sido isolado, pouquíssimas espécies foram estudadas extensivamente. Os principais constituintes da família Melastomataceae são compostos polifenólicos, especialmente taninos oligoméricos hidrolisáveis de pesos moleculares superiores ou igual a 3800, alguns flavonoides e antocianinas aciladas (Isaza et al., 2007).

Do gênero *Bellucia*, apenas duas espécies (*B. grossularioides* e *B. pentâmera*) foram estudadas do ponto de vista fitoquímico e apresentaram diferença considerável na composição química. A espécie *B. grossularioides* foi rica em compostos de média polaridade enquanto a espécie *B. pentâmera* apresentou como composto majoritário o esqualeno (Cass e Degani, 2001; Isaza et al., 2007).

No único estudo fitoquímico com extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* foram detectadas as presenças de ácidos graxos, flavonoides, terpenos, taninos condensados e hidrolisáveis (Moura et al., 2013). O teor dos compostos fenólicos (taninos condensados, taninos hidrolisáveis e de flavonoides) presentes no extrato aquoso também foram determinados por ensaios colorimétricos, comprovando o alto teor de taninos nesse extrato

(Moura et al., 2014). Porém, não existem trabalhos referentes aos compostos bioativos isolados.

O extrato aquoso das cascas de *Bellucia dichotoma* foi eficaz no bloqueio de atividades biológicas induzidas pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops atrox*, serpentes responsáveis pela maioria dos acidentes nas regiões Sudeste e Norte do Brasil, respectivamente (Moura et al., 2013; Moura et al., 2014; Moura et al., 2014). Pelo exposto, o presente trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar os princípios ativos envolvidos nas ações bloqueadoras do extrato aquoso, o que poderá contribuir na obtenção de novos fármacos para o tratamento de acidentes ofídicos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Reagentes e materiais**

Foram utilizados acetronitrila e metanol grau HPLC (Tedia, Brazil<sup>®</sup>) e ácido fórmico P.A. da Isofar. Para filtração do solvente grau HPLC foram usadas membranas de nylon 0,22 µm (Tedia Brasil<sup>®</sup>). A água ultrapura foi obtida através de sistema Direct-Q3 18,2 MΩ.cm (Millipore<sup>®</sup>). Para o tratamento das amostras (*clean up*) foram utilizados cartuchos Strata-X com fase estacionária C18, todos da Phenomenex.

### **2.2. Obtenção do veneno de *Bothrops atrox* (VBa) e soro antibotrópico (SAB)**

*Bothrops atrox* adultas, foram coletadas na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada no Km 83 da BR-163, Santarém, PA, Brasil. Em seguida, os espécimes foram mantidos no biotério das Faculdades Integradas do Tapajós- FIT, Santarém-PA, sob a responsabilidade do MSc. Hipócrates de Menezes Chalkidis e com autorização do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA número 26/2013. O veneno foi coletado, liofilizado e mantido a -20 °C, até o momento do uso. A coleta de serpentes e a extração do veneno foram aprovadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - nº 14018). O soro antibotrópico (SAB) utilizado foi o de Lote nº: 105113B, produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

### 2.3. Animais

Camundongos *Swiss* do sexo masculino (34 - 41 g), foram obtidos do Biotério da Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brasil. Os animais foram mantidos em condições-padrão (temperatura  $22 \pm 1$  °C, ciclo de 12 h claro/12 h escuro) e acondicionados em gaiolas-padrão, com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes da Lei Federal 11.794 e com aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade do Estado do Pará (UEPA) com o número de protocolo 43/11.

### 2.4. Material vegetal

#### 2.4.1. Coleta e identificação

Amostras 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, Brasil, no período de março de 2013. A identificação botânica da espécie foi realizada pela Doutora Regina Célia Viana Martins da Silva do Herbário da EMBRAPA/Amazônia Oriental (Belém – PA, Brasil). Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário sob o código (IAN): 1852213.

#### 2.4.2. Obtenção do extrato aquoso das cascas de *Bellucia dichotoma* (EABd)

O extrato aquoso foi preparado com base em informações populares, de acordo com a prática dos moradores das comunidades do Eixo Forte da Região Oeste do Pará, Amazônia, seguindo protocolo de Moura et al., 2014. Para isto, foram utilizados 50 g de pó das cascas de *Bellucia dichotoma* extraído 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 (chá por decocção). Após esfriar, retirou-se 150 mL, que é a quantidade equivalente a um copo de chá, como utilizado popularmente. Em seguida, foi liofilizado e o peso final seco do extrato foi de 2,9 g.

### 2.5. Perfil cromatográfico do extrato aquoso

O perfil cromatográfico do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*, foi adaptado a partir da metodologia proposta por Snyder et al. (1997). Para isso, 10 mg do extrato aquoso liofilizado foram solubilizados em 1 mL do sistema H<sub>2</sub>O:ACN 2:8 (v/v). A solução foi filtrada em filtro de seringa 0,22 µm. Em seguida, volumes de 20 µL dessa solução de extrato foram injetadas em HPLC, utilizando como fase estacionária uma coluna Gemini C18 (250 x

4,6 mm, 5  $\mu$ m) acoplada a pré-coluna C18 (4,0 x 30,0 mm), em fluxo de 1 mL/min e como fase móvel o modo de eluição gradiente de ampla composto pelos solventes H<sub>2</sub>O (A) e ACN (B), variando linearmente de 5 a 100% do modificador orgânico (B), em 60 minutos e detector UV operando em varredura de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

## **2.6. Desenvolvimento do método para isolamento**

### **2.6.1. Extração em Fase Sólida (SPE)**

O método utilizado para pré-concentração da amostra, foi a Extração em Fase Sólida (SPE), objetivando-se a eluição dos analitos de interesse e, por conseguinte reter as impurezas e/ou interferentes. Para isso, foram utilizados cartuchos Strata-C18 da Phenomenex, com 50 mg de fase estacionária e 1,0 mL de volume. O cartucho Strata-C18 foi condicionado com 1,0 mL de metanol (MeOH) e em seguida 1,0 mL de H<sub>2</sub>O. 10 mg do extrato bruto foram solubilizados com 1 mL de H<sub>2</sub>O e submetidos a banho ultrassônico por um minuto. A solução foi filtrada em membrana de seringa e levada a evaporação total do solvente para cálculo de rendimento. Após evaporação, o resíduo foi ressuspensionado em 1 mL de H<sub>2</sub>O. A solução foi aplicada no cartucho, recolhendo-se a solução de interesse em seguida passou-se mais um volume de H<sub>2</sub>O, sendo coletado no mesmo recipiente. Após esta etapa passou-se dois volumes do sistema (1 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1, v/v) e coletado em um segundo recipiente. O solvente de cada recipiente foi evaporado em capela (para cálculo de rendimento), sendo em seguida ressuspensionado com 1 mL do sistema H<sub>2</sub>O:ACN 2:8 v/v, acidificado a 1% com ácido fórmico, de onde se retirou uma alíquota de 20  $\mu$ L, injetando-a no cromatógrafo líquido (de acordo com metodologia descrita no item 2.5).

Após análise em cromatógrafo líquido foi confirmado a separação do extrato aquoso em dois blocos (frações FBd1 e FBd2). Inicialmente a fração FBd1 foi selecionada para o isolamento dos seus constituintes, e como a fração FBd2 apresentou rendimento muito baixo ( $\pm$  10%), será utilizada em outro momento do estudo.

### **2.6.2. Instrumentação e condições cromatográficas de análise da fração FBd1**

A partir do perfil obtido da fração FBd1, foi possível desenvolver um estudo proposto por Snyder e Dolan (1996) que avaliaram a possibilidade de eluição em modo isocrático mediante avaliação do tempo de retenção da última banda.

As condições cromatográficas definidas para a separação dos componentes majoritários da fração FBd1 foram: eluição de 35 minutos do tipo isocrática em uma coluna Synergi Fusion Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) acoplada a uma coluna de guarda C18 (4 x 30 mm, 5  $\mu$ m). A fase móvel consistiu em 95:5 H<sub>2</sub>O:ACN acidificada a 1% com ácido fórmico conduzida pelo sistema a uma vazão de 1 mL/minuto. O comprimento de onda utilizado pelo detector de fotodiodos foi de 280 nm e volume de injeção de 20  $\mu$ L.

### 2.6.3. Isolamento dos constituintes químicos (HPLC-prep)

Após determinado o melhor sistema de separação das substâncias (fração FBd1) no modo isocrático, foi retirada uma alíquota de 1 g do extrato bruto de *Bellucia dichotoma* e submetida a um pré-tratamento por Extração em Fase Sólida (SPE), utilizando cartucho C18 (5 g/20 mL) da Phenomenex.

O cartucho foi condicionado com 20 mL de MeOH e em seguida 20 mL de H<sub>2</sub>O. 1 g do extrato bruto foi solubilizado com 20 mL de H<sub>2</sub>O e submetido a banho ultrassônico por um minuto. A solução foi filtrada em filtro de seringa e levada a evaporação total do solvente para cálculo de rendimento. Após evaporação, o resíduo foi ressuscitado em 20 mL de H<sub>2</sub>O. A solução foi aplicada no cartucho, recolhendo-se a solução de interesse; em seguida passou-se mais um volume de H<sub>2</sub>O, sendo coletado no mesmo recipiente. Após esta etapa passou-se dois volumes do sistema (20 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1, v/v) e coletado em um segundo recipiente. O solvente de cada recipiente foi evaporado em capela e obteve um rendimento total de 0,89 g (fração FBd1- 0,8 g e fração FBd2 - 0,09 g). Em seguida, 400 mg da massa recuperada da fração FBd1 foi solubilizada em 8 mL do sistema de ACN:H<sub>2</sub>O 17:73 v/v), passado em filtro de seringa e injetado em HPLC semi-preparativo, utilizando-se um volume de 200  $\mu$ L, por injeção, para o isolamento das substâncias. Para o isolamento das substâncias presentes na fração FBd1, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência LC-6 (SHIMADZU). Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna semi-preparativa Synergi Fusion Phenomenex C18 (250 x 10 mm, 5  $\mu$ m). As amostras coletadas foram secas no sistema Büchi Syncore.

### 2.7. Elucidação estrutural das substâncias

Os três compostos isolados foram enviados ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Pará-UFPA, onde foram obtidos os espectros de RMN unidimensionais (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT) e bidimensionais (COSY, HETCOR, HMBC e NOE-diff), a partir dos quais estão sendo realizadas as elucidações estruturais das substâncias.

## 2.8. Avaliação do potencial antiofídico dos compostos isolados

### 2.8.1. Atividade Hemorrágica

A hemorragia induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* foi determinada de acordo com o método descrito por Kondo et al. (1960), com modificações. A Dose Mínima Hemorrágica (DMH) foi definida como a menor quantidade de veneno capaz de induzir lesão hemorrágica de 10 mm de diâmetro, padronizada em 10 µg para esse pool de veneno (Moura et al., 2014). Para avaliar a ação bloqueadora dos compostos isolados do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*, foi utilizado inicialmente o protocolo de pré-incubação, onde foram injetados, no dorso dos camundongos, pela via intradérmica 50 µL de solução contendo 10 µg de veneno de *B. atrox* (2DMH), pré-incubados com os compostos isolados na proporção de 1:1 (m:m), foram utilizados controle com salina ou soro antibotrópico + *B. atrox* na proporção (1:5); Uma hora após a injeção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os tecidos dorsais foram removidos, fotografados, as imagens digitalizadas, salvas como arquivos RGB e processadas de acordo com Dougherty (1992), usando um script Matlab (Gonzalez et al., 2009). Os componentes da imagem foram selecionados por um dispositivo de limiar (Guerra et al., 2011) e um processador de gradiente morfológico foi utilizado para a obtenção dos halos. A área (mm) e o maior diâmetro foram medidos de acordo com Dougherty e Lotufo (2003).

Posteriormente, será utilizado o protocolo de pós-tratamento, onde concentrações dos compostos isolados do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* serão administradas por via oral logo após a injeção do veneno de *Bothrops atrox* (10 µg). Serão utilizados grupo controle com salina (via oral) ou soro antibotrópico (via plexo venoso oftálmico). Após uma hora, os animais serão sacrificados por deslocamento cervical, os tecidos dorsais serão removidos e os halos hemorrágicos medidos como descrito acima.

### 2.8.2. Atividade Fosfolipásica A<sub>2</sub>

A inibição da atividade fosfolipásica foi mensurada pela atividade hemolítica indireta em gel de agarose. A dose mínima hemolítica indireta (DMHi) foi calculada segundo Gutiérrez et al. (1988) e determinada como uma medida da atividade fosfolipase A<sub>2</sub>, definida como a quantidade de proteína que produz um halo mínimo de 10 mm, padronizada em 1,25 µg, para o pool de veneno utilizado (Moura et al., 2014). O efeito bloqueador dos compostos isolados do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* na hemólise foi avaliado inicialmente incubando-os previamente por 30 minutos a 37° C com 2DMHi do veneno na proporção de

1:1 (veneno:compostos, m:m). Alíquotas de 15 µL contendo as misturas foram aplicadas nos poços sobre as placas de vidro cobertas com a mistura (agarose 1%, gema de ovo e eritrócitos). Posteriormente, será realizado o teste com concentrações dos compostos isolados incorporados ao gel na etapa final de preparação (sem pré-incubação). A atividade enzimática será expressa como percentual de inibição, onde 100% de inibição corresponde à ausência do halo.

### **2.8.3. Atividade coagulante**

A atividade coagulante será calculada de acordo com Assakura et al. (1992). Sendo expressa pelo tempo médio de coagulação em segundos de 100 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 será medido em segundos e observado visualmente. Será determinada a dose mínima coagulante (DMC) que é a concentração de veneno capaz de coagular o plasma em 60s.

O efeito bloqueador dos compostos isolados na atividade coagulante do veneno será realizado utilizando dois protocolos experimentais: (1) Pré- incubação, avaliado incubando-os previamente com duas DMC do veneno por 30 minutos a 37 °C nas proporções de 1:1 e 1:5 (m:m) DMC:Compostos. Em seguida a mistura será adicionada ao plasma e a coagulação monitorada como descrito acima. (2) Concentrações dos compostos isolados serão adicionadas sem a pré-incubação, ao plasma e a coagulação monitorada visualmente. Nos dois protocolos avaliados será utilizado controle-positivo realizado com o veneno incubado com a salina ou a salina e o veneno adicionado sobre o plasma. A ausência da rede de fibrina após decorrido um tempo máximo de 10 minutos será considerado como 100% de inibição, ou, no caso dos compostos isolados, ausência de atividade.

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

Para verificar o efeito da interação dos compostos isolados do extrato de *Bellucia dichotoma* com proteínas do veneno de *Bothrops atrox*, será realizado eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970), utilizando-se inicialmente, gel de corrida na concentração de 12,5% e o de empacotamento, 5%. Neste processo alíquotas de veneno e compostos isolados serão incubadas por 30 minutos à 37 °C na proporção de 1:5 veneno:extrato (m/m), centrifugadas a 1300 rpm por 5 minutos, e analisado sob condições não redutoras. Um gel será corado com Coomassie Brilhante Blue (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) e o outro será utilizado no Western blot. Dessa forma, as proteínas

contidas no gel serão transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45  $\mu\text{m}$  (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 será 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) serão adicionados seguindo a diluição de 1:1000 no tampão de TBS por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida a membrana será 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. A revelação se deu com a adição da solução cromógena (Diaminobenzidina-DAB), em presença do substrato da peroxidase, o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a 30%. A reação será interrompida por sucessivas lavagens com água destilada.

## **2.10. Análises estatísticas**

Os resultados serão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão. Para comparação das médias será utilizado Análise de Variância (ANOVA One-Way), seguida do pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado será de  $p < 0,05$ .

## **3. Resultados preliminares**

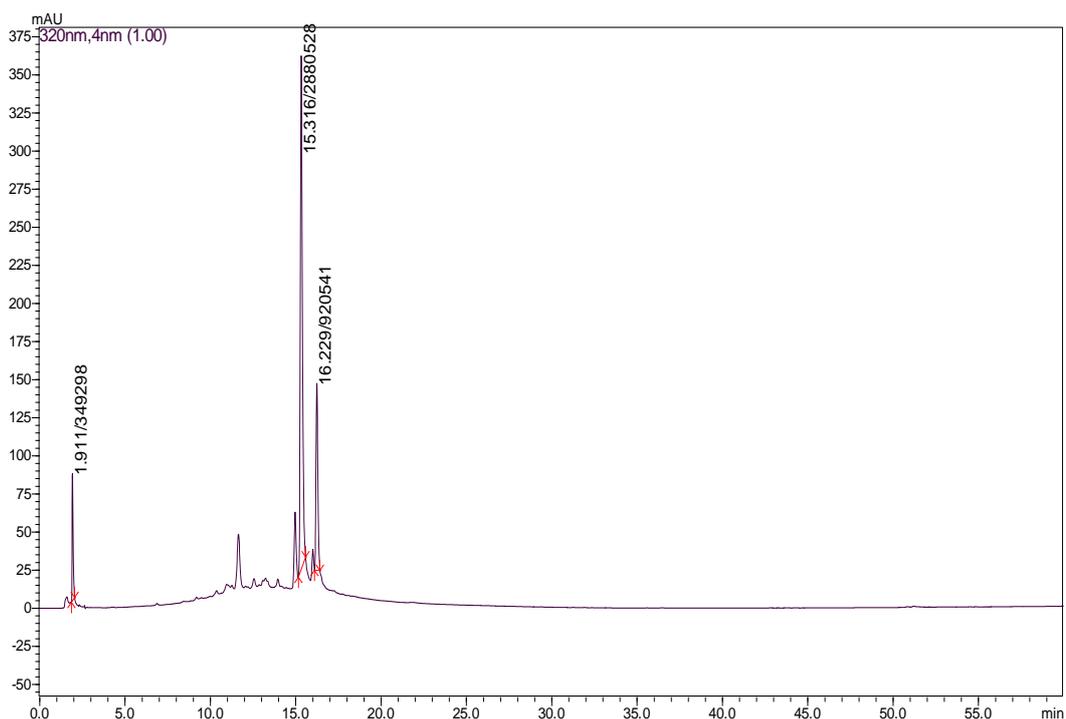
### **3.1. Isolamento dos constituintes químicos do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma***

Iniciou-se a otimização do método cromatográfico em fase reversa, para o isolamento dos constituintes presentes no extrato aquoso de *B. dichotoma* a partir do perfil cromatográfico, que compreende em uma eluição gradiente de ampla extensão com fase móvel composta por solvente A =  $\text{H}_2\text{O}$  e B = ACN, conforme descrito no item 2.3.

A metodologia que Snyder e Dolan (1996) desenvolveram para o uso de gradiente de ampla extensão serve de guia para o desenvolvimento de métodos por HPLC, onde a relação  $(\text{Trz} - \text{Tra})/\text{Tg}$ , deve apresentar valores inferiores a 0,4 ou seja, a faixa de retenção deve ser menor que 40% do tempo do gradiente. O perfil cromatográfico do extrato das cascas de *B. dichotoma* apresentou pelo menos 10 picos entre a faixa de tempos de retenção de 8 a 17 minutos, dos quais três eram bem intensos majoritários, sugerindo ser uma amostra de pouca complexidade cromatográfica e ótima para a otimização de uma separação no modo de eluição isocrática (Fig.1). O cálculo foi realizado para os valores dos tempos de retenção dos

picos observados no extrato. Analisado o resultado obtido 0,15, este foi inferior a 0,4 demonstrando que a separação podia ser realizada no modo de eluição isocrático.

Considerando ainda o estudo de Snyder e Dolan (1996), é possível propor valores desejáveis para o fator de retenção  $k$  ( $k = 5$ ;  $k = 10$ ;  $k = 20$ ), baseado nos tempos de retenção da última banda. Como o tempo de retenção da última banda foi 16,22 minutos (Fig.1). Optou-se por uma separação com  $k = 10$ , já que o método foi utilizado para o isolamento.



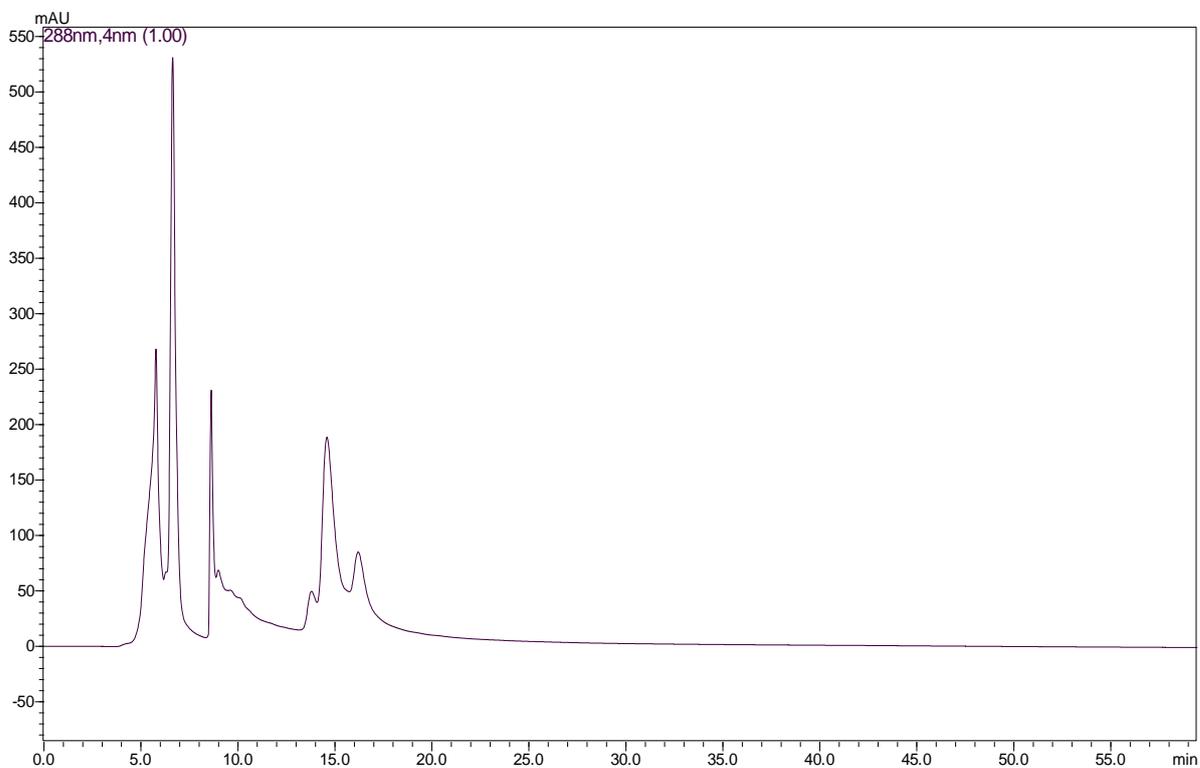
**Fig. 1.** Perfil cromatográfico do extrato aquoso da casca de *Bellucia dichotoma*. Fase móvel composta por H<sub>2</sub>O/ACN variando de 5 a 100% de ACN em um tempo de 60 minutos, em modo linear e vazão de 1 mL/minuto.

O percentual do modificador orgânico (B) proposto por Snyder et al. (1997) (tabela 1) para esta separação foi 78:22 H<sub>2</sub>O:ACN (Fig. 2). Por ser observado o alargamento das bandas nessa análise, a adição de 1% de ácido fórmico na fase móvel foi necessária para uma melhor resolução dos picos (cromatograma com ACN acidificada – Fig. 3). Embora tenha se encontrado um bom tempo de análise para isolamento (20 min), escolheu-se por enfraquecer a fase móvel, diminuindo o percentual de orgânico para garantir um melhor fator de separação ( $\alpha$ ) entre os picos de interesse, fixando a fase móvel em 83:17 H<sub>2</sub>O:ACN (com 1% ácido fórmico) (cromatograma 17% ACN acidificada – Fig. 4) .

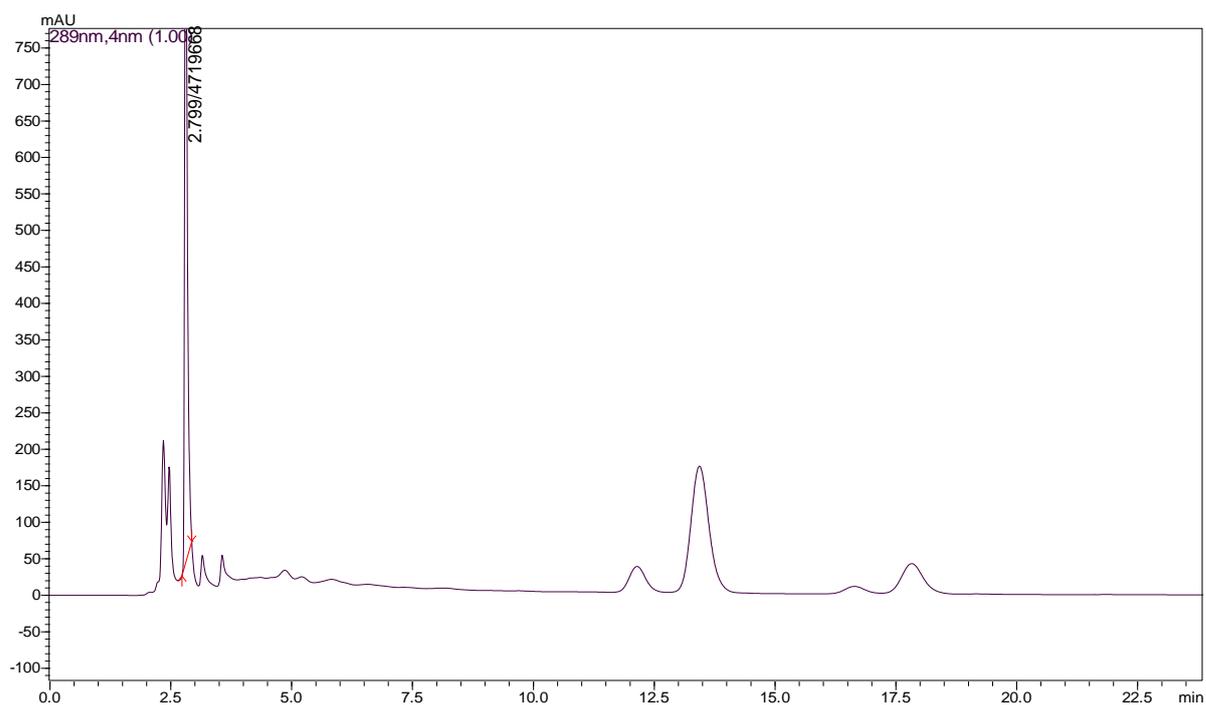
**Tabela 1.** Estimativa do % do solvente B para eluição isocrática, baseada no tempo de retenção da última banda  $t_{rz}$  do gradiente inicial (Snyder et al., 1996)

$T_{rz}(\text{min})$	K=5 (% de ACN)	K=10 (% de ACN)	K=20 (% de ACN)
5	6	0	-
10	19	12	5
15	29	22	14
20	37	30	22
25	45	38	30
30	53	46	38
35	61	54	46
40	69	62	54
45	77	70	62
50	85	78	70
55	93	86	78
60	100	94	86
65	-	100	94

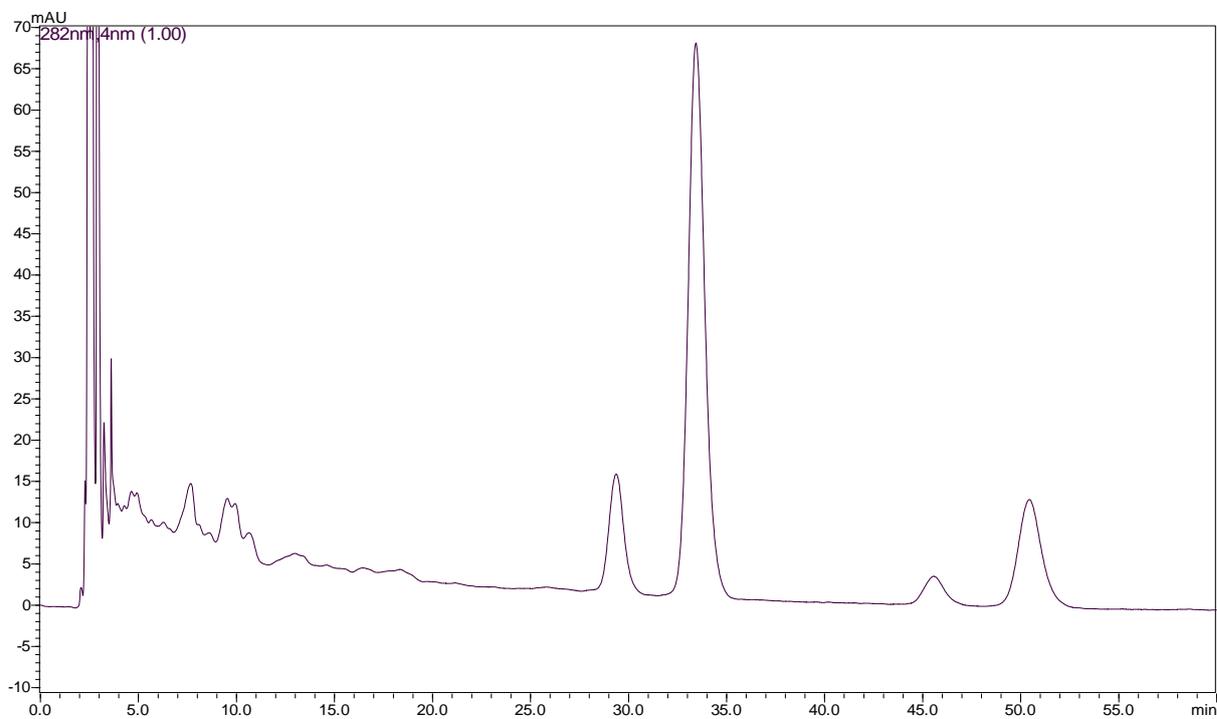
**Condições:** coluna 150 x 4,6 mm; gradiente 5-100% de ACN em 60 minutos; vazão 1 mL/min (SNYDER, 1996).



**Fig.2.** Cromatograma do extrato das cascas de *Bellucia dichotoma* 22% de ACN.



**Fig. 3.** Cromatograma do extrato aquoso das cascas de *Bellucia dichotoma* (78:22 H<sub>2</sub>O:ACN acidificado com 1% ácido fórmico).

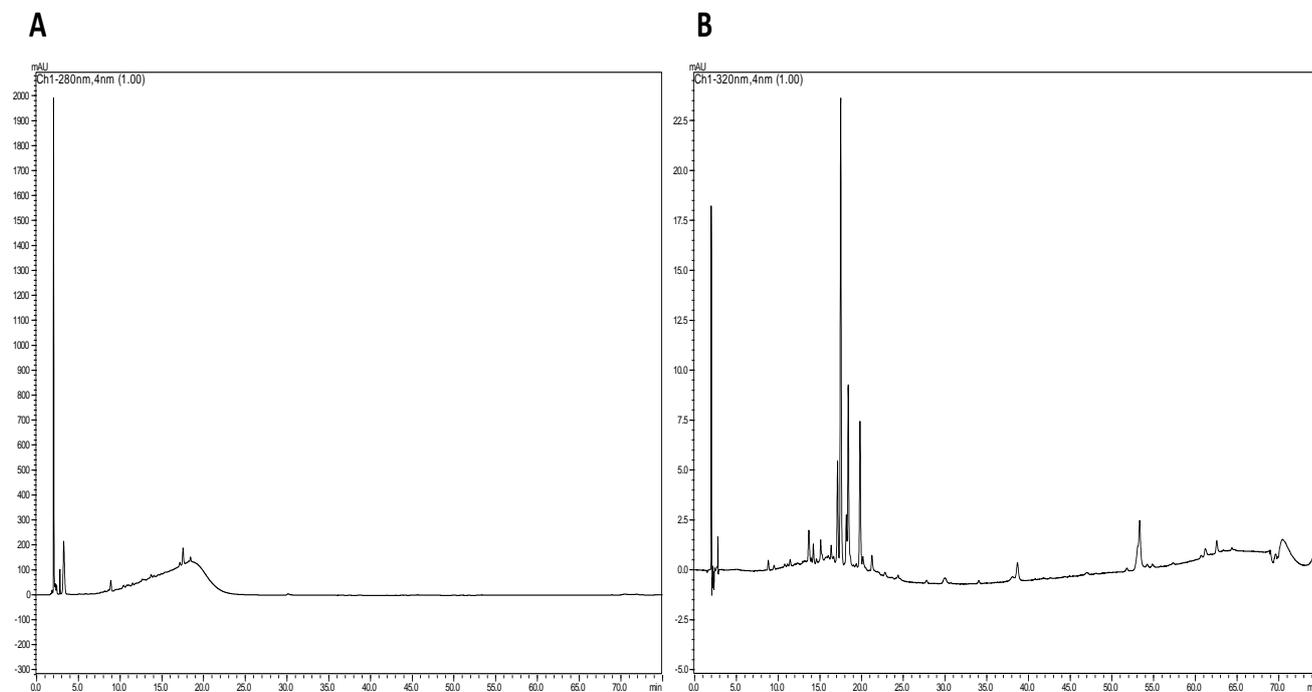


**Fig. 4.** Cromatograma do extrato aquoso das cascas de *Bellucia dichotoma* (H<sub>2</sub>O:ACN 73:17 acidificado 1% ácido fórmico).

Após isolamento das quatro substâncias de interesse, o rendimento foi muito baixo inviabilizando a metodologia proposta para isolamento, sendo necessário a otimização de uma outra metodologia para isolamento do extrato aquoso. Sendo assim, com o objetivo de obter maior concentração dos compostos isolados e um sistema com menor tempo de análise, foi realizado extração em fase sólida (SPE) do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*, com intuito de separar os componentes do extrato aquoso em duas faixas de tempo de retenção.

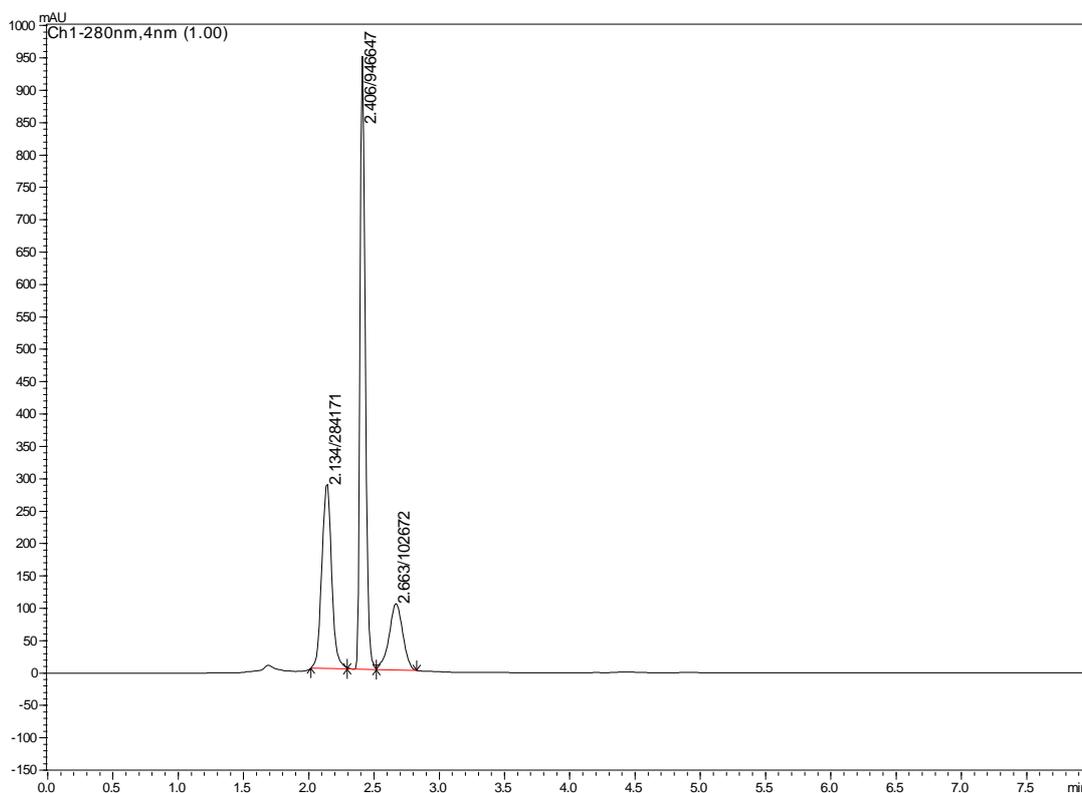
### 3.1.2. Otimização do método e isolamento das substâncias

Após extração em fase sólida (SPE) do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*, foram originadas duas frações (FBd1 e FBd2 – Fig. 5 A e B), sendo selecionada a fração FBd1 para continuação do isolamento. Analisando o cromatograma abaixo (Fig. 5 A), foi observado que o tempo de retenção para o último pico de interesse foi de 18 minutos. Com isso, foi calculado um valor teórico para o percentual do modificador orgânico baseado nos estudos de Snyder et al. (1997) segundo a tabela 1. Para se estimar um valor de percentual do modificador orgânico, optou-se por uma separação com  $k = 10$ , uma vez que se deseja isolar, e foi sugerido como sistema isocrático ACN/H<sub>2</sub>O 30% v/v. No entanto, os sistemas propostos por Snyder não foram eficientes, uma vez que não foi observado uma boa resolução entre as substâncias, havendo assim, a necessidade de uma otimização do método.

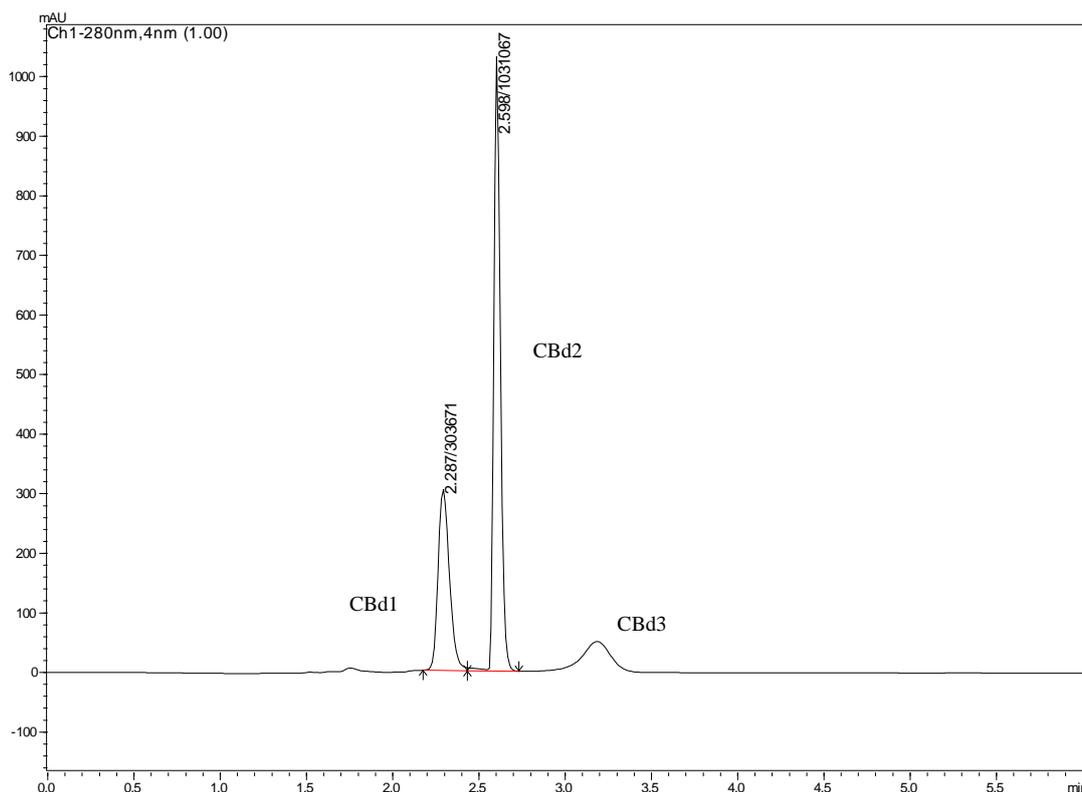


**Fig. 5:** Perfil cromatográfico das frações originadas da Extração em Fase Sólida (SPE). Onde, A) FBd1; B) FBd2. Eluição modo gradiente, Fase móvel composta por H<sub>2</sub>O/ACN variando de 5 a 100% de ACN em um tempo de 60 minutos, em modo linear e vazão de 1 mL/minuto.

Uma vez que o sistema proposto por Snyder et al. (1997), não se apresentou satisfatório na separação das substâncias, foram testados os sistemas H<sub>2</sub>O/ACN 17%, 15% e 10% e 5%, todos na relação v/v, sendo o sistema H<sub>2</sub>O/ACN 5% o que apresentou melhor resolução entre os picos de interesse, no entanto, o fator de separação ( $\alpha$ ) não foi satisfatório (Fig. 6). Sendo assim, utilizou-se o sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 5%, o qual apresentou melhor resolução e separação dos 3 compostos da Fração FBd1 do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* (Fig. 7).



**Fig. 6.** Cromatograma no modo de eluição isocrático da fração FBd1. Fase móvel H<sub>2</sub>O/ACN 95:5 v/v e vazão de 1 mL/minuto. Detecção de UV  $\lambda = 280$  nm.



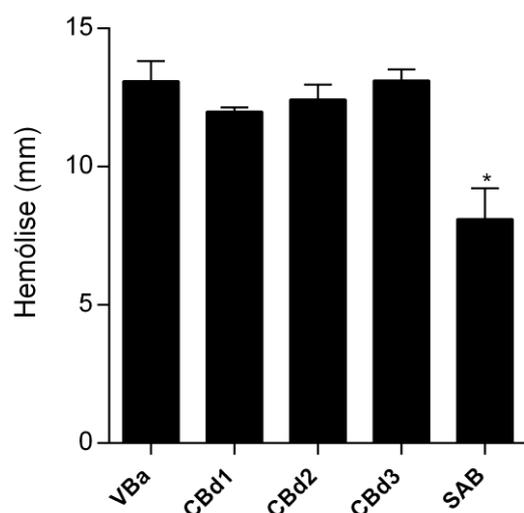
**Fig. 7.** Cromatograma no modo de eluição isocrático da fração FBd1. Fase móvel H<sub>2</sub>O/MeOH 95:5 v/v e vazão de 1 mL/minuto. Detecção de UV  $\lambda = 280$  nm.

Foram isolados três compostos da fração FBd1, com uma recuperação de: 98,1 mg (CBd1); 38,9 mg (CBd2) e 27,5 mg (CBd3). 10 mg de cada composto isolado foram utilizados para análises em RMN, e o restante utilizado para teste preliminar de inibição da atividade fosfolipásica e hemorrágica induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*.

### 3.2. Teste de bloqueio contra atividades biológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*

#### 3.2.1. Inibição da atividade fosfolipásica

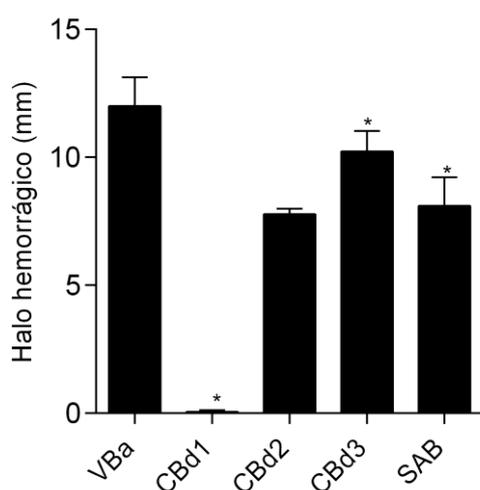
Os compostos isolados (CBd1, CBd2 e CBd3) do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* não foram capazes de bloquear significativamente a atividade fosfolipásica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* na concentração avaliada (Fig. 8). Porém, para o soro antibotrópico a inibição foi de 38,1% na proporção avaliada (1:5, m:m).



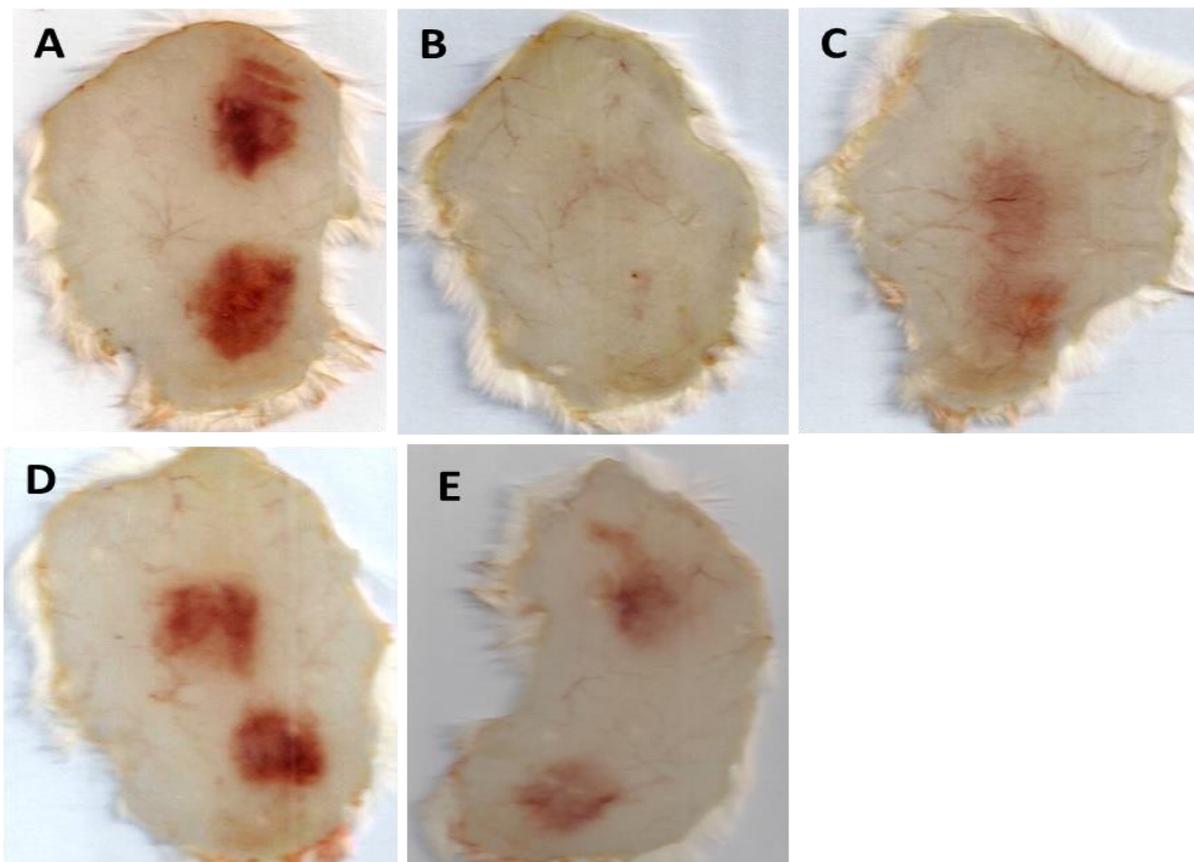
**Fig. 8.** Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops atrox* pelos compostos isolados do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*. Pré-incubação 1:1 (veneno: compostos, m:m). \*  $p < 0,05$  vs. Controle (VBa) e salina teste de Tukey,  $n = 4$ /por grupo.

### 3.2.2. Inibição da atividade hemorrágica

A hemorragia induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, foi inibida 100% quando utilizado o composto isolado CBd1 na proporção de 1:1 (veneno:CBd1, m:m). No entanto, o composto CBd2 utilizado na mesma proporção foi capaz de reduzir 35,2% o diâmetro do halo hemorrágico, sendo mais eficaz que o SAB que reduziu 33,1% (Fig. 9). Ao contrário do composto CBd3 onde não houve redução significativa para esta atividade (Fig. 10).

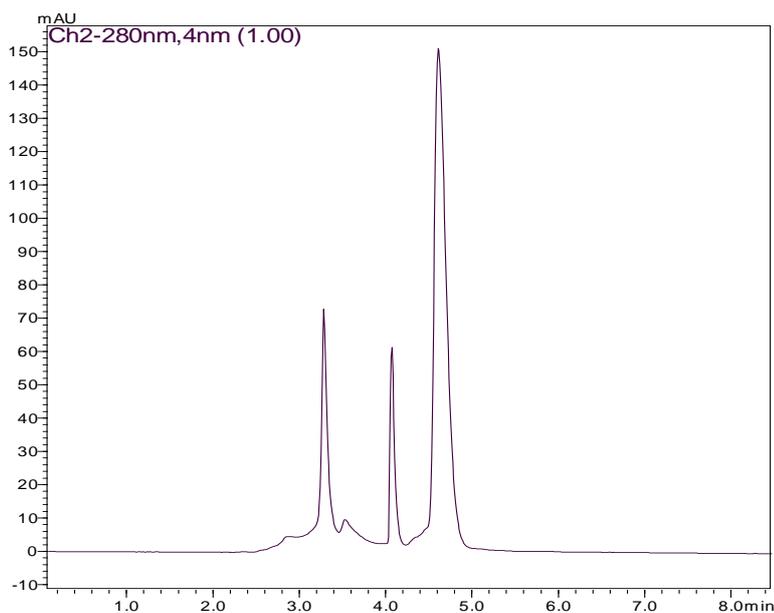


**Fig. 9.** Inibição da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* pelos compostos isolados de *Bellucia dichotoma*, no protocolo de pré-incubação (veneno:compostos, 1:1, m:m). \*  $p < 0,05$  vs. Controle (VBa) teste Tukey,  $n = 4$ /por grupo.



**Fig. 10:** Imagem da pele dos animais no teste de inibição da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* pelos compostos isolados de *Bellucia dichotoma* na proporção de 1:1 (veneno:compostos, m:m). Onde, A) veneno de *B. atrox* (10  $\mu$ g); B) CBd1 + veneno de *B. atrox* (1:1, m:m); C) CBd2 + veneno de *B. atrox* (1:1, m:m); D) CBd3 + veneno de *B. atrox* (1:1, m:m); E) Soro antibotrópico + veneno de *B. atrox* (1:5, m:m).

O composto CBd1 bloqueou 100% a atividade hemorrágica no protocolo de pré-incubação (veneno:composto), porém, o composto CBd2 bloqueou 35%, e como os picos apresentaram o tempo de retenção muito próximos (tempos de 2 e 2,5 minutos aproximadamente), foi necessário o aperfeiçoamento do método de isolamento utilizando uma coluna Kinetex C18 (100 mm x 4,6 mm, 2.6  $\mu$ m). Assim ao analisar a fração FBd1 no modo analítico vimos que o composto CBd1 não estava puro, e apareceu um novo pico no tempo de retenção de 3,5 minutos (Fig. 11). Portanto, para a continuação do estudo será utilizada uma nova fase estacionária (coluna Hilic – phenomenex), para aumento de retenção dos compostos polares, assim como será utilizado espectrômetro de massas de alta resolução para auxiliar na elucidação estrutural das substâncias.



**Fig. 11.** Cromatograma da eluição isocrática da fração FBd1, Fase móvel composta por: H<sub>2</sub>O/ACN 95:5 v/v, acidificado a 0,1% de ácido fórmico, em tempo de 7 minutos e vazão de 1 mL/minuto. Fase estacionária coluna Kinetex C18 (100 mm x 4,6 mm, 2,6 μm). A coluna de segurança ou pré-coluna foi um Krudkatcher Ultra In-Line Filter contendo, em seu interior, um cartucho Porosity 0,5μ x 0,004 in ID adquirido da Phenomenex® (Torrance, CA, USA).

#### 4. Perspectivas

Quando não se dispõe de estudos químicos da espécie de interesse, como é o caso de *Bellucia dichotoma*, a análise fitoquímica preliminar indica o grupo de metabólitos secundários presentes no extrato da espécie. Neste caso, o interesse está restrito às substâncias responsáveis pela atividade antiofídica que a espécie apresentou frente ao veneno de *Bothrops atrox*. Pela análise fitoquímica em cromatografia em camada delgada (CCD), foi possível detectar a presença de ácidos graxos, flavonoides, terpenos, taninos condensados e hidrolisáveis e por ensaios colorimétricos determinamos os teores de taninos condensados, taninos hidrolisáveis e flavonoides. A tentativa de desenvolver um método de isolamento foi direcionada para essas classes de metabólitos. Pelo método proposto por HPLC conseguimos isolar três compostos da fração FBd1, sendo que o composto CBd1 bloqueou totalmente a atividade hemorrágica. No entanto, não foi possível elucidar a estrutura do composto, pois havia mais uma substância presente, o que inviabilizou as análises dos espectros obtidos por RMN. Assim, os próximos passos serão o aperfeiçoamento do método de isolamento da fração FBd1 utilizando uma fase estacionária que aumenta a retenção dos compostos polares (coluna Hilic); a injeção da fração no Espectômetro de massas de alta resolução e a obtenção

dos espectros de RMN unidimensionais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT) e bidimensionais (COSY, HETCOR, HMBC e NOE-diff) para auxiliar na elucidação estrutural dos compostos. Após elucidação, os compostos serão testados nas demais atividades biológicas induzidas pelo veneno, para correlacionarmos com o potencial antiofídico da espécie *B. dichotoma*.

## 5. Referências bibliográficas

- Assakura, M. T., Furtado, M. F., Mandelbaum, F. R., 1992. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 102, 727-732.
- Cass, Q. B., Degani, A. L. G., 2001. Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. São Paulo, EdUFSCar.
- Dougherty, E. R., 1992. An introduction to morphological image processing. Bellingham, WA, SPIE- International Society for Optical Engineering.
- Dougherty, E. R., Lotufo, R. A., 2003. Hands-on morphological image processing. Bellingham, SPIE press.
- Gonzalez, R. C., Woods, R. E., Eddins, S. L., 2009. Digital image processing using MATLAB. Knoxville, TN, Gatesmark Publishing.
- Guerra, C. E., Xavier, A. R., Andrade, A. J. N., 2011. Watershed Threshold and Gray Level Morphology Applied to Object Detecting in Remote Sensing and Petrographics images. 12th International Congress of the Brazilian Geophysical Society. Rio de Janeiro, Brasil.
- Gutiérrez, J. M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 26, 411-413.
- Isaza, M., Hipólito, J., Orozco, L. M., Rivera, D. A., Tapias, L. J., Ramírez, A., Stella, L., Veloza, C., Angela, L., Zuleta, L. M., 2007. Perfis cromatográficos preliminares por GC-MS de algumas espécies de plantas melastomatáceas. *Scientia et Technica*. 359-362.
- Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R., 1960. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn J Med Sci Biol*. 13, 43-52.

- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 227, 680-685.
- 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.
- Moura, V. M., Sousa, L. a. F., Dos-Santos, M. C., Raposo, J. D. A., Lima, A. E., Oliveira, R. C., Silva, M. N., Mourão, R. H. V., 2014. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: an assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. *Journal of Ethnopharmacology* 161, 224-232.
- Moura, V. M., Sousa, L. a. F., Oliveira, R. B., Silva, A. M. M., Chalkidis, H. M., Silva, M. N., Pacheco, S., Moura, 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 Plants Research*. 7, 2330-2337.
- Romero, R., Martins, A. B., 2002. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Brazilian Journal of Botany*. 25, 19-24.
- Snyder, L. R., Dolan, J. W., 1996. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development I. Use of a starting gradient run. *Journal of Chromatography A*. 721, 3-14.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L., 1997. *Practical HPLC method development*, John Wiley & Sons.

## ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

- ✓ **2013 - Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts**

Valéria Mourão de Moura<sup>1</sup>, Luciana A. F. de Sousa<sup>1</sup>, Ricardo B. de Oliveira<sup>1</sup>, Ana M. M. da Silva<sup>2</sup>, Hipócrates de M. Chalkidis<sup>3</sup>, Milton N. da Silva<sup>4</sup>, Sergio Pacheco<sup>5</sup> and Rosa H. Veras Mourão<sup>1,\*</sup>

- ✓ **2013 - The effect of the aqueous extract of *Myrcia guianensis* (Aubl) DC and its fractions against the hemorrhagic activity of *Bothrops jararaca* venom**

Luciana A. Freitas-de-Sousa<sup>1,2</sup>, Valéria Mourão de Moura<sup>1,2</sup>, Juliana D. A. Raposo<sup>2</sup>, Leijiane F. de Sousa<sup>4</sup>, Ricardo B. de Oliveira<sup>1,2</sup>, Lourivaldo S. Santos<sup>6</sup>, Railda N. M. Araújo<sup>6</sup>, Ana M. Moura da Silva<sup>1,4</sup>, Elenn P. Aranha<sup>2</sup>, Chieno Suemitsu<sup>3</sup>, Carlos E. Guerra<sup>1</sup>, Hipócrates de M. Chalkidis<sup>5</sup>, Sérgio Pacheco<sup>7</sup>, Rosa H. Veras Mourão<sup>1,2,\*</sup>

- ✓ **2014 - 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**

Valéria Mourão de Moura<sup>a,b,\*</sup>, Adrielle N. Serra Bezerra<sup>c</sup>, Rosa H. Veras Mourão<sup>c</sup>, Juliana L. Varjão Lameiras<sup>a,b</sup>, Juliana D. A. Raposo<sup>c</sup>, Rafael Luckwu de Sousa<sup>b</sup>, Antônio Luiz Boechat<sup>b</sup>, Ricardo B. de Oliveira<sup>c</sup>, Hipócrates de M. Chalkidis<sup>d</sup>, Maria Cristina Dos-Santos<sup>a,b</sup>

- ✓ **2015 - Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: Na assessment of their effectiveness ininhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom**

Valéria Mourão de Moura<sup>a,b,n</sup>, Luciana A. Freitas-de-Sousa<sup>a</sup>, Maria Cristina Dos-Santos<sup>b</sup>, Juliana Divina A. Raposo<sup>a</sup>, Aline E. Lima<sup>a</sup>, Ricardo B. de Oliveira<sup>a</sup>, Milton Nascimento da Silva<sup>c</sup>, Rosa Helena Veras Mourão<sup>a</sup>.

- ✓ **2016 - The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation**

Valéria Mourão de Moura<sup>a,1</sup>, Wania C. Rodrigues da Silva<sup>b,1</sup>, Juliana D.A. Raposo<sup>c</sup>, Luciana A. Freitas-de-Sousa<sup>d</sup>, Maria Cristina Dos-Santos<sup>a</sup>, Ricardo B. de Oliveira<sup>b</sup>, Rosa H. V. Mourão<sup>b</sup>

- ✓ **2016 - *Connarus favosus* Planch.: Na inhibitory of the hemorrhagic activity of *Bothrops atrox* venom and a potential antioxidante and antibacterial agent**

Thaís Pereira da Silva<sup>a,e,\*</sup>, Valéria Mourão de Moura<sup>a,e</sup>, Maria C. S. de Souza<sup>a,c,e</sup>, Vanessa N. C. Santos<sup>c</sup>, Kissinara, A.M. M. da Silva<sup>c</sup>, Mara G. G. Mendes<sup>c</sup>, Cecília Verônica Nunez<sup>a,c</sup>, Patrícia D. O. de Almeida<sup>d</sup>, Emerson S. Lima<sup>d</sup>, Rosa H. V. Mourão<sup>b</sup>, Maria Cristina Dos-Santos<sup>a,e</sup>

## TRABALHOS EM ANDAMENTO ORIUNDOS DA TESE

Devido ao potencial de inibição do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* frente a atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*, foram realizados experimentos para avaliar o efeito do extrato sobre atividade local induzida pelo veneno, por meio de análise morfométrica e histopatológica. Os seguintes trabalhos de iniciação científica e mestrado estão em andamento:

### ✓ Iniciação científica

Quantificação de mastócitos locais, em camundongos, injetados com o veneno de *Bothrops atrox* e tratados com a espécie vegetal antiofídica *Bellucia dichotoma* (aluna: Thaís Martins).

Estudo comparativo das lesões hepáticas encontradas em camundongos injetados com o veneno de *Bothrops atrox* e tratados com a espécie vegetal *Bellucia dichotoma* (aluna: Thaís Martins).

Estudo comparativo de nefrotoxicidade encontrada em camundongos injetados com o veneno de *Bothrops atrox* e tratados com a espécie vegetal *Bellucia dichotoma* (aluna: Adryadne da Silva Adolfs).

Estudo comparativo de nefrotoxicidade encontrada em camundongos injetados com o veneno de *Bothrops atrox* e tratados com a espécie vegetal *Bellucia dichotoma* (aluna: Yanna Queiroz Pereira de Sá).

Verificação do potencial antiofídico dos extratos aquosos de *Bellucia dichotoma* Cogn., oriundos do Pará e Amazonas, frente às atividades coagulante e enzimática do veneno de *Bothrops atrox* (aluna: Luana Yamille Andrade de Souza).

Desenvolvimento, padronização e atividade miotóxica de extrato seco de *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) (aluna: Fernanda Yasmin da Silva Leal).

### ✓ Dissertação de mestrado

Ação do extrato de *Bellucia dichotoma* cogn. (melastomataceae) sobre os danos hepáticos, renais e esplênicos provocados pelo veneno da serpente *Bothrops atrox*: uma investigação estereológica (orientanda: Marissa Braga dos Anjos).

## **ANEXOS**

- 1.** Autorização comitê de ética para utilização de animais.
- 3.** Autorização SISBIO para coleta de serpentes.



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ  
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo N° 43/11

Título do Projeto de Pesquisa: **Efeitos de extratos vegetais sobre atividades biológicas induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox* da região de Santarém-PA.**

Pesquisador Responsável: **Prof. Dra. Rosa Helena Veras Mourão.**

Instituição: **Universidade Federal do Oeste do Pará.**

Data do Parecer: 17/10/11.

**PARECER**

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do COBEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

**LIBERADO** para o início da pesquisa sendo obrigatório a entrega neste CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

Belém, 17 de outubro de 2011.

**Rosa Helena de F. Chaves**  
MÉDICA VETERINÁRIA  
CRMV/PA 2029

M.V. Esp. ROSA HELENA DE FIGUEIREDO CHAVES  
VICE-COORDENADORA DO CEUA/UEPA



## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 14018-8</b>	<b>Data da Emissão: 29/08/2013 17:50</b>	<b>Data para Revalidação*: 28/09/2014</b>
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: HIPÓCRATES DE MENEZES CHALKIDIS	CPF: 631.999.982-91
Título do Projeto: ECOLOGIA E HISTÓRIA NATURAL DE UMA TAXOCENOSE DE SERPENTES DA FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS, BELTERRA, PA, BRASIL.	
Nome da Instituição : Instituto Santareno de Educação Superior	CNPJ: 05.410.725/0001-71

### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Georreferenciamento das áreas	03/2009	03/2009
2	Instalação das armadilhas	03/2009	06/2009
3	Abertura das trilhas	03/2009	06/2009
4	Coleta de espécimes	03/2009	12/2014
5	Tombamento nas coleções	03/2009	12/2014
6	Retirada das armadilhas	01/2015	01/2015
7	Entrega do relatório final	02/2015	02/2015

### 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 IBAMA nº 154/2007 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 <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (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 e o material biológico coletado apreendido 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, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
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.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

### Outras ressalvas

1	1-Os pit-fall devem conter aparatos que diminuam stress (insolação e/ou afogamento) dos animais, os quais devem ser fechados ou retirados quando inativos. O pesquisador é responsável pela inspeção das armadilhas diariamente. 2) O quantitativo poderá ser restringido pelos gestores da FLONA Tapajós. 3) A coleta de 20 espécimes/espécie de squamata deve ser para taxa abundantes, especialmente de lagartos. O pesquisador deve ter parcimônia nas coletas com serpentes. Preferencialmente deverá coletar os animais já mortos. 4) Para trabalho de dieta recomendamos o uso de técnicas que preservem os animais, tais como FLUSHING (SOLÉ, M.; BECKMANN, O.; PELZ, B.; KWET, A. 2005. Stomach-flushing for diet analysis in anurans: an improved protocol...Studies on Neotropical Fauna and Environment 40(1):23-28)
---	--

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 19676647**





## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 14018-8</b>	<b>Data da Emissão: 29/08/2013 17:50</b>	<b>Data para Revalidação*: 28/09/2014</b>
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: HIPÓCRATES DE MENEZES CHALKIDIS	CPF: 631.999.982-91
Título do Projeto: ECOLOGIA E HISTÓRIA NATURAL DE UMA TAXOCENOSE DE SERPENTES DA FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS, BELTERRA, PA, BRASIL.	
Nome da Instituição : Instituto Santareno de Educação Superior	CNPJ: 05.410.725/0001-71

2	Salientamos a necessidade de contato com os gestores da unidade em tempo hábil para emissão de autorização de entrada para a equipe de campo e comunicação dos locais de coleta.
---	--

### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	ubaldo de almeida farias junior	Colaborador/Pesquisador	616.566.312-53	2214875 segup-PA	Brasileira
2	DIANA REGO AMAZONAS	Colaborador	746.050.032-15	4227604 SEGUP-PA	Brasileira
3	Pedro Henrique Salomão Ganança	Colaborador	011.666.792-33	37642977x SSP-PA	Brasileira
4	Marcos Anaicy Silva Carvalho	Colaborador/Pesquisador	706.499.952-87	3293926 SSP-PA	Brasileira
5	Waylla de Souza Pereira	Colaboradora	014.251.282-62	6702053 SSP-PA	Brasileira
6	Isla Carol Marialva Camargo	Colaboradora	961.540.202-87	5570693 SEGUP-PA	Brasileira
7	Lara Dias Pacheco	Colaboradora	947.074.132-34	5155487 SSP-PA	Brasileira
8	Eucieldi Pantoja de Oliveira	Mateiro	627.017.972-68	3568956 SSP-PA	Brasileira
9	SARA RABELO LEITÃO	Colaboradora	982.981.862-49	4872748 PCIVIL-PA	Brasileira
10	thayana crisley lira da silva	Colaboradora	030.512.842-62	6968477 segup-PA	Brasileira
11	Marise Helen Vale de Oliveira	Colaboradora	014.286.412-97	5864310 ssp-PA	Brasileira
12	Lucas Meireles de Sousa	Colaborador	963.119.832-49	5296777 SSP-PA	Brasileira
13	Juliana Pimentel Lourido	Colaboradora	938.858.572-00	4333987 segup-PA	Brasileira
14	Jhonathan Fonseca Galucio	Colaborador	010.742.662-50	62828226 segup-PA	Brasileira
15	Renata de Souza Oliveira	Colaboradora	004.180.692-12	5687475 SSP-PA	Brasileira
16	Renata Cíntia Pereira Rodrigues	Colaboradora	030.233.252-94	6841443 ssp-PA	Brasileira

### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BELTERRA	PA	FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS	UC Federal
2	SANTAREM	PA	FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS	UC Federal
3	RUROPOLIS	PA	FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS	UC Federal
4	AVEIRO	PA	FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS	UC Federal
5	PIACAS	PA	FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS	UC Federal
6	ALENQUER	PA	Alenquer	Fora de UC Federal
7	MONTE ALEGRE	PA	Monte Alegre	Fora de UC Federal
8	ORIXIMINA	PA	Oriximiná	Fora de UC Federal
9	SANTAREM	PA	Santarém	Fora de UC Federal
10	SANTAREM	PA	Alter-do-Chão	Fora de UC Federal
11	BELTERRA	PA	Belterra	Fora de UC Federal

### Atividades X Táxons

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 19676647**





## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 14018-8</b>	<b>Data da Emissão: 29/08/2013 17:50</b>	<b>Data para Revalidação*: 28/09/2014</b>
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: HIPÓCRATES DE MENEZES CHALKIDIS	CPF: 631.999.982-91
Título do Projeto: ECOLOGIA E HISTÓRIA NATURAL DE UMA TAXOCENOSE DE SERPENTES DA FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS, BELTERRA, PA, BRASIL.	
Nome da Instituição : Instituto Santareno de Educação Superior	CNPJ: 05.410.725/0001-71

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chilopoda, Clitellata, Araneae, Geophilomorpha, Scorpiones, Squamata, Anura, Parasitiformes, Scolopendromorpha, Entognatha, Gymnophiona, Diplopoda, Insecta
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Anura (*Qtde: 10), Geophilomorpha (*Qtde: 10), Clitellata (*Qtde: 10), Parasitiformes (*Qtde: 10), Chilopoda (*Qtde: 10), Entognatha (*Qtde: 10), Diplopoda (*Qtde: 10), Squamata (*Qtde: 20), Araneae (*Qtde: 10), Scorpiones (*Qtde: 10), Gymnophiona (*Qtde: 10), Scolopendromorpha (*Qtde: 10), Insecta (*Qtde: 10)
3	Observação e gravação de imagem ou som	Insecta, Scorpiones, Geophilomorpha, Gymnophiona, Scolopendromorpha, Squamata, Araneae, Chilopoda, Diplopoda, Entognatha, Clitellata, Anura, Parasitiformes

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

### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue, Secreção
2	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Secreção
3	Amostras biológicas (Répteis)	Fragmento de tecido/órgão, Secreção, Escama, Regurgitação/conteúdo estomacal, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue
4	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Armadilha de queda "pit fall", Captura manual
5	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual, Guarda-chuva entomológico
6	Método de captura/coleta (Répteis)	Puçá, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Coleta manual, Funil trap, Armadilha de queda "pit fall", Captura manual, Laço com cabo de aço
7	Método de marcação (Anfíbios)	Biopolímero
8	Método de marcação (Répteis)	Pintura de escamas, Tatuagem, Microchip

### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Instituto Santareno de Educação Superior	coleção
2	INSTITUTO BUTANTAN	coleção
3	MUSEU PARAENSE EMILIO GOELDI	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 19676647**







### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 14018-8</b>	<b>Data da Emissão: 29/08/2013 17:50</b>	<b>Data para Revalidação*: 28/09/2014</b>
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: HIPÓCRATES DE MENEZES CHALKIDIS	CPF: 631.999.982-91
Título do Projeto: ECOLOGIA E HISTÓRIA NATURAL DE UMA TAXOCENOSE DE SERPENTES DA FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS, BELTERRA, PA, BRASIL.	
Nome da Instituição : Instituto Santareno de Educação Superior	CNPJ: 05.410.725/0001-71

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 19676647**

