

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

JHULIMAR GUILHERME DOERL

ATIVIDADE ANTIOFÍDICA INDUZIDA PELO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Ocotea notata

SÃO GABRIEL

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

JHULIMAR GUILHERME DOERL

ATIVIDADE ANTIOFÍDICA INDUZIDA PELO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Ocotea notata

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Cháriston André Dal Belo

Coorientador: Lúcia Vinadé

SÃO GABRIEL

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

JHULIMAR GUILHERME DOERL

ATIVIDADE ANTIOFÍDICA INDUZIDA PELO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Ocotea notata

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Cháriston André Dal Belo

Coorientador: Lúcia Vinadé

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 23 de janeiro de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dr. Andres Delgado Cañedo
UNIPAMPA

Dr^a. Adriana Koslovski Sassi
UPAMPA

SÃO GABRIEL

2015

AGRADECIMENTOS

Aqueles que conseguiram me suportar durante esses 04 anos e aqueles que não conseguiram também.

O Matheus, a Thamiris e o Lucas merecem uma menção honrosa neste momento, por me suportarem e me apoiarem em todas as dificuldades.

Ao meu orientador por me mostrar que se você não fizer por si mesmo ninguém o fará e que por mais que pareça desestimulante você sempre tem que seguir em frente.

Agradecimentos escritos não são suficientes para demonstrar o que sinto por meus pais, mas sempre gosto de mencioná-los. São apenas as melhores pessoas que conheço e que são capazes de abdicar de tudo para que eu possa ter o que quero.

RESUMO

Os acidentes ofídicos afetam milhões de pessoas no mundo todo ano, principalmente em regiões tropicais, isso fez com que em abril de 2009 a Organização Mundial da Saúde os incluíssem na lista de doenças tropicais negligenciadas. O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças ou contra o efeito de venenos em acidentes com escorpiões, abelhas, vespas, e principalmente cobras, vem sendo mostrado como terapia complementar ou alternativa às terapias convencionais a muito tempo. Os mecanismos de interação entre os extratos de plantas com características antiofídicas e os componentes que são responsáveis pelos efeitos severos do envenenamento como as fosfolipases A₂, proteases, hemorraginas, hialuronidases, proteases, citotoxinas, miotoxinas e neurotoxinas não são muito claros, o que requer estudos mais aprofundados. A demora no tratamento é um fator que agrava a situação neste tipo de acidente aumentando a gravidade e os danos neurológicos tanto periférico como central. Assim, a busca por biocomplexos e substâncias bioativas nas plantas relacionadas com características antiofídicas e neuroprotetoras se mostra como uma perspectiva para diminuição da gravidade desses acidentes e possível forma de terapia conjunta a já existente em casos de envenenamento. Frente a isso, o presente trabalho observou o potencial neuroprotetor e antiofídico do extrato hidroalcoólico de *Ocotea notata* tanto no sistema nervoso central como no periférico e avaliou um possível mecanismo de ação farmacológica sobre injúrias causadas pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* a cascavel brasileira. A determinação da especificidade das interações químicas entre as toxinas do veneno e os componentes bioativos das plantas é o ponto chave para o desenvolvimento de fitocomplexos que exibam uma verdadeira eficácia farmacológica e uma menor perda do seu potencial terapêutico. Para o estudo das características neuroprotetora e antiofídica do extrato de *Ocotea notata*, foram utilizadas as técnicas de fatias de hipocampo de camundongo, ensaio de MTT e eletromiografia de *biventer cervicis* de pintainho, com um n= 5 amostras para cada condição. Com estes experimentos observou-se que o extrato de *Ocotea notata* não induz neurotoxicidade central e periférica em sistema nervoso de mamíferos e aves e que induz neuroproteção contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Foi visto também que a sua eficiência em contrapor os efeitos neurotóxicos do veneno crotálico pode estar associada à presença de flavonóides no extrato, sendo assim, estes resultados reforçam o potencial biotecnológico do extrato como um agente antineurotóxico de origem natural.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Características importantes da subespécie *Crotalus durissus terrificus*.
- Figura 2 - Esquema resumindo as principais ações intracelulares da crotoxina em nervo e músculo.
- Figura 3 - Frutos e folhas de *O. notata*.
- Figura 4 - Efeito do EHON na viabilidade celular de fatias hipocâmpais de camundongos.
- Figura 5 - Efeito do Cdt na viabilidade celular de fatias hipocâmpais de camundongos.
- Figura 6 - Atividade neutralizante de *O. notata* contra o veneno de Cdt em preparação *biventer cervicis* de pintainho.
- Figura 7: Atividade neutralizante e de reversão do bloqueio neuromuscular de *O. notata* contra o veneno de Cdt em preparação *biventer cervicis* de pintainho.

LISTA DE ABREVIATURAS

Cdt – *Crotalus durissus terrificus*

PLA₂ - Fosfolipases A₂

EHON – Extrato hidroalcoólico de *Ocotea notata*.

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

E.P.M – Expresso por média \pm desvio padrão.

SUMÁRIO

2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 ACIDENTES OFÍDICOS.....	9
2.2 SERPENTES DO GÊNERO CROTALUS	10
2.3 VENENO DE <i>CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS</i>	10
2.3.1 CROTOXINA.....	11
2.3.2 CROTAMINA	11
2.4 <i>OCOTEA NOTATA</i> (NEES) MEZ	13
3 JUSTIFICATIVA	15
4 OBJETIVOS	16
4.1 OBJETIVO GERAL	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5 METODOLOGIA.....	17
5.1. REAGENTES E VENENOS.....	17
5.2. ANIMAIS.....	17
5.3. PREPARAÇÃO DE FATIAS DE HIPOCAMPO.....	17
5.4. VIABILIDADE DAS FATIAS DE HIPOCAMPO	18
5.5 PREPARAÇÃO <i>BIVENTER CERVICIS</i> DE PINTAINHO.....	18
5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	18
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6.1 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	19
6.2 <i>BIVENTER CERVICIS</i>	21
7 CONCLUSÕES.....	24
REFERÊNCIAS	25

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Acidentes Ofídicos

Estima-se que cerca de 5,4 a 5,5 milhões de pessoas no mundo sejam acometidas por acidentes ocasionados por serpentes no mundo por ano, esse número é mais evidente em países tropicais e subtropicais. Os envenenamentos ofídicos representam um sério problema de saúde pública nos países subdesenvolvidos, atingindo aproximadamente 420.000 a 2.280.000 de pessoas por ano, sendo que dessas, cerca de 20.000 a 25.000 evoluem para o óbito (KASTURIRATNE et al. 2008; WARRELL, 2010). Isto fez com que em abril de 2009 a Organização Mundial da Saúde incluísse acidentes ofídicos na lista de doenças tropicais negligenciadas, aumentando assim o enfoque para este tipo de acidente. (KASTURIRATNE et al, 2008)

No Brasil as serpentes são consideradas as principais causadoras de acidentes por animais peçonhentos. No mundo existem cerca de 3.000 espécies de serpentes, sendo 410 consideradas venenosas. Os gêneros de serpentes venenosas encontradas no Brasil são: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. (CEVAP, 2014)

Uma média de 20.000 casos de acidentes ofídicos ocorrem no Brasil a cada ano sendo a maioria deles na Região Sudeste. A maioria dos acidentes ocorre no verão, ou seja, entre janeiro e abril de cada ano.

Os indivíduos do sexo masculino (74,84%), na faixa etária entre 15 e 49 anos e lavradores são os mais acometidos. Nestes casos trata-se de acidente do trabalho. As regiões do corpo mais acometidas são os membros inferiores (62,75%), seguidas dos membros superiores (12,15%). Esses números podem ser maiores, pois, muitas vezes esses acidentes são subnotificados (CEVAP 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Uma das maiores dificuldades no que se refere a acidentes ofídicos é a demora no tratamento. A terapia utilizada atualmente é a sorológica, com soro específico para cada tipo de serpente e está só pode ser administrada por equipe médica em unidade hospitalar devido ao alto risco de reações anafiláticas que podem ser causadas pelo soro antiofídico (MOURA; MOURÃO, 2012).

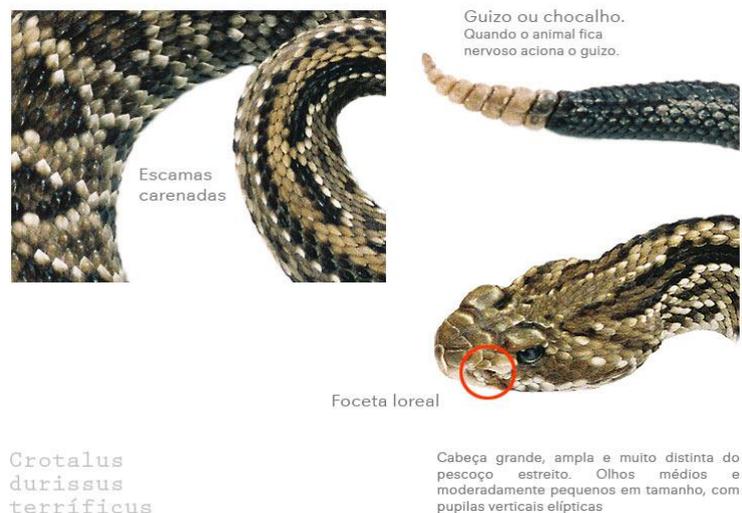
A demora no tratamento agrava os sintomas do envenenamento e pode levar a sequelas irreversíveis e morte. Sendo assim, o estudo de compostos que possam auxiliar no desenvolvimento de uma terapia conjunta a sorológica seria de grande importância no

tratamento de acidentes ofídicos e na diminuição da intensidade dos sintomas de envenenamentos.

2.2 Serpentes do Gênero *Crotalus*

Serpente do gênero *Crotalus*, popularmente conhecidas por cascavéis, são encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas e são raras nas faixas litorâneas. São facilmente identificadas por possuírem na porção terminal da cauda um guizo ou chocalho (Figura 1), característica peculiar da espécie, (PINHO et al. 2000) cabeça triangular, olhos pequenos com pupila em fenda, presença de fosseta loreal e escamas na cabeça, dentição solenóglifa, cauda com guizo ou chocalho (CEVAP, 2014).

Figura 1 - Características importantes da subespécie *Crotalus durissus terrificus*: fosseta loreal, chocalho no fim da cauda e escamas carenadas.



Fonte: Museum Nantes.

2.3 Veneno de *Crotalus durissus terrificus*

A serpente da subespécie *Crotalus durissus terrificus*, conhecida como cascavel brasileira, é a segunda mais importante causa de acidentes ofídicos no Brasil (MOURA; MOURAO, 2012).

O seu veneno foi inicialmente estudado por SLOTTA, (1938) tendo sua primeira proteína isolada e cristalizada conhecida como crotoxina. A composição do veneno de Cdt é uma mistura de enzimas, proteínas, peptídeos e toxinas. Sendo as principais: a crotoxina, crotamina, giroxina, e convulxina (BARRAVIEIRA *et al.*, 1995). Essa mistura de compostos induz neurotoxicidade, distúrbios de coagulação, miotoxicidade sistêmica e insuficiência renal aguda, cuja toxicidade decorre principalmente na presença da fosfolipase A₂ crotoxina (ZORNETTA *et al.*, 2012)

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são um complexo heterodimérico, neurotóxico que é o principal responsável pelos sintomas de paralisia progressiva e mionecrose em concentrações elevadas (MONTECUCCO *et al.*, 2008).

2.3.1 Crotoxina

A crotoxina é o principal componente do veneno da Cdt, foi a primeira proteína purificada e cristalizada a partir de um veneno de serpente. A crotoxina é uma β -neurotoxina heterodimérica composta por uma base fraca tóxica fosfolipase A₂ (PLA₂) e uma parte ácida não tóxica e não enzimática a crotapotina (SAMPAIO *et al.*, 2010). Pode agir de diferentes maneiras nas células (Figura 2) e normalmente os efeitos da crotoxina são: miotóxico (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008), neurotóxico (VITAL BRAZIL *et al.*, 2000), nefrotóxico (AMORA *et al.*, 2006; BARONE; FREZZATTI; SILVEIRA, 2014) e cardiotoxico (HERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

Nos terminais nervosos, a crotoxina induz alterações na liberação e recaptção do neurotransmissor Acetilcolina levando a uma diminuição lenta e progressiva da contração muscular o que resulta em um bloqueio neuromuscular total (SIMIONI *et al.*, 1990).

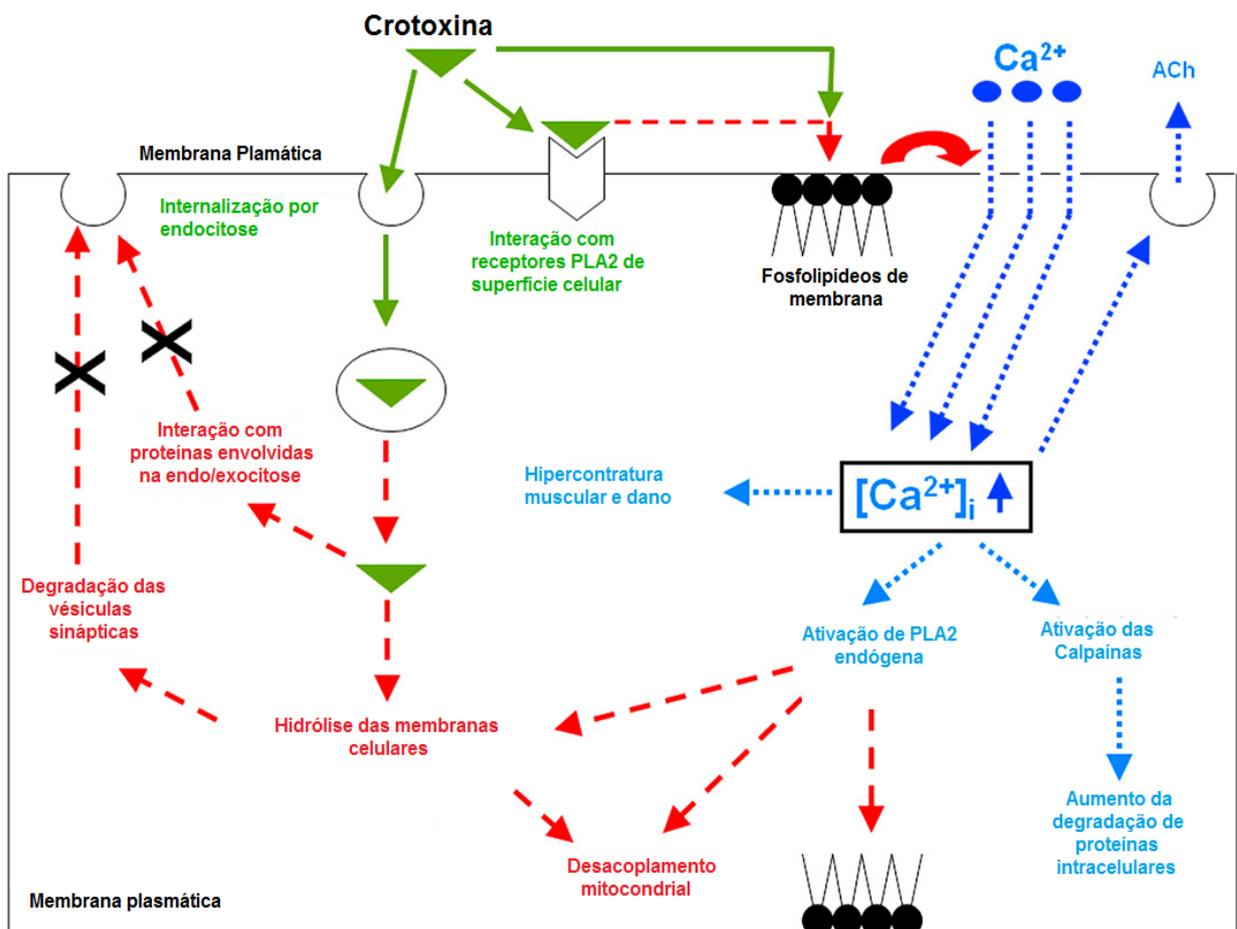
2.3.2 Crotamina

A crotamina é uma miotoxina polipeptídica não enzimática, composta por 42 resíduos de aminoácidos com um peso molecular de 4880 Da (MANCIN *et al.*, 1998). É a segunda principal toxina no veneno de Cdt, está envolvida na despolarização da musculatura esquelética e na permeabilidade a íons de sódio (Na⁺) o que sugere uma ligação com canais de sódio voltagem dependente (RUFF; LENNON, 1998).

Frações isoladas do veneno podem ter efeitos diversos no sistema nervoso central, como no caso da crotamina que em doses baixas intrahipocámpais pode promover o aumento

da memória persistente em mamíferos (VARGAS *et al.*, 2014). A crotoxina também apresentou uma melhora no tratamento de ratos miastênicos (HERNANDEZ-OLIVEIRA, *et al.* 2013), na entrega de agentes antitumorais (KERKIS, *et al.* 2010) e na ativação de canais de cálcio (Ca^{2+}) sensíveis a rianodina, aumentando a liberação basal de acetilcolina e dopamina no sistema nervoso central de ratos. (CAMILLO, *et al.* 2001).

Figura 2 - Esquema resumindo as principais ações intracelulares da crotoxina em nervo e músculo. As setas verdes indicam a interação com receptores de membranas e sua interiorização por endocitose ou receptação de vesículas podendo agir diretamente na lise celular. As setas vermelhas indicam a via de interação com lipídeos de membrana que altera a permeabilidade da membrana e perda da seletividade de íons aumentando o influxo de Ca^{2+} . As setas azuis indicam a via de entrada de Ca^{2+} extracelular aumentando a sua concentração intracelular o que leva a (1) aumento da liberação de acetilcolina no terminal nervoso, (2) hipercontratura muscular (3) ativação de PLA2 endógenas (4) ativação de mecanismos de degradação celular. A ativação dessas vias leva ao bloqueio neuromuscular e necrose celular.



Fonte: Adaptado de (SAMPAIO, *et al.* 2010)

2.4 *Ocotea notata* (Nees) Mez

A *Ocotea notata* (*O. notata*) (Figura 3) é uma árvore de aproximadamente 15m de altura com floração entre fevereiro e março e frutificação em maio, junho e novembro. Apresenta uma distribuição ao longo da costa atlântica brasileira, desde Sergipe até o Paraná, ocorrendo principalmente nas restingas. (QUINET, 2005).

Primeiramente foi considerada como *O. glaucina* (Meisn.) Mez e *O. gardneri* (Meisn.) Mez como sinônimos de *O. notata*. Em 1889, Mez já considerava as espécies afins entre si, diferenciando-as pela forma das folhas e, principalmente, pelo tipo de habitat; as duas primeiras tidas como típicas de floresta Atlântica Montana e Baixo-montana e a última restrita às restingas (QUINET; ANDREATA, 2002).

Nestas regiões onde é encontrada é popularmente conhecida como canela-branca e sua madeira é muito utilizada para fazer moirões e também para fins ornamentais e suas cascas e folhas são muito utilizadas pela medicina popular (KROPF *et al*, 2006).

Figura 3: Frutos e folhas de *O. notata*.



Fonte: Jens G. Rohwer

Apesar do crescente número de publicações com espécies de *Ocotea* e também da utilização de várias dessas espécies na medicina popular, o primeiro estudo fitoquímico com *O. notata* foi feito por Garret (2014). Neste estudo foram identificadas 10 substâncias que já haviam sido descritas na literatura. Estas são: (+)-catequina, (-)-epicatequina, uma proantocianidina trimérica seqüenciada como (epi)catequina-A-(epi)catequina-(epi)catequina,

isoquercitrina, reinoutrina, miquelianina, quercitrina, kaempferol-3-O- α -ramnopiranosídeo, quercetina e kaempferol. (GARRETT *et al.* 2014).

O óleo essencial de *O.notata* demonstrou atividade antibacteriana comprovada pelo teste de difusão em disco (GARRETT, et al. 2007) e também atividade anti-herpética (GARRETT, 2012). Essa gama de atividades biológicas mostra diversidade de utilização e potencial biotecnológico deste extrato vegetal.

A descrição fitoquímica da espécie é de fundamental importância para estudos de atividade dos compostos bioativos advindos dos seus extratos, pois, podemos comparar suas atividades com compostos já conhecidos e tentar elucidar mecanismo de ação e potenciais usos biotecnológicos. No caso da *O. notata* a sua composição rica em flavonoides e em análogos da quercetina foi um importante dado, pois, sabe-se que estes compostos podem influenciar nos mecanismos de ação das PLA₂.

3 JUSTIFICATIVA

A busca de novos compostos naturais bioativos com propriedades neuroprotetoras e antiofídicas é de suma importância. A grande dificuldade encontrada para o socorro imediato das vítimas de acidente ofídicos, pode levar a uma piora do quadro clínico, acarretando muitas vezes danos irreversíveis ao sistema nervoso. A utilização de compostos de fácil manuseio e aplicação poderia diminuir esses danos e diminuir a gravidade desses acidentes.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Analisar o potencial antiofídico e neuroprotetor do extrato de *Ocotea notata* frente ao veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

4.2 Objetivos específicos

- Investigar se o extrato hidroalcoólico de *O. notata* possui atividade neurotóxica periférica e central por meio de ensaios em junção neuromuscular de aves e fatias de cérebro de camundongos.
- Observar a atividade antiofídica do extrato de *Ocotea notata* na junção neuromuscular de aves frente ao veneno de *Crotalus durissus terrificus*.
- Estudar o possível mecanismo da ação antiofídica da *Ocotea notata* sobre o sistema nervoso central de mamíferos e periférico de aves frente ao veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

5 METODOLOGIA

5.1. Reagentes e venenos.

Todos os produtos químicos e reagentes foram obtidos da Sigma, Aldrich, Merck ou BioRad. O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, foi gentilmente doado pelo Dr Jisé Carlos Cogo, do Centro de Estudos da Natureza (CEN) da Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP.

O extrato de *O. notata* foi gentilmente cedido pelo Dr Leandro Machado Rocha da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense.

5.2. Animais.

Camundongos adultos com peso entre (28–35g) de ambos os sexos foram fornecidos pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os pintainhos, HY-LINE com idade 4 -10 dias, serão fornecidos pela agropecuária Sinuelo (São Gabriel, RS, Brasil) e mantidos no biotério da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA). Os animais foram mantidos em condições de ciclo de 12 horas de luz e escuro, com comida e água *ad libitum*. O estudo foi feito em concordância com as diretrizes do Conselho Brasileiro para experimentação animal (COBEA) e CEUA UNIPAMPA.

5.3. Preparação de fatias de Hipocampo.

Camundongos foram decapitados e tiveram os cérebros removidos imediatamente, o hipocampo foi dissecado e mantido em gelo, umedecido com solução HEPES-salina gelada aerada com O₂ (124mM NaCl, 4mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 12mM glicose, 1mM CaCl₂, e 25mM e HEPES pH 7,4). As fatias de hipocampo foram obtidas com o *Mclwain tissue chopper*, que foi usado para obter fatias de aproximadamente 0,4 mm, que foram separadas e pré-incubadas a 37°C por 30 min em placas de micropoços com solução HEPES-salina (200µL/fatia) (DAL BELO, 2013). Posteriormente o meio fresco foi substituído (200µL/fatia) para a condição controle e tratamentos com Cdt (10 µg/mL), EHON (50-300 µg/mL), EHON (150 µg/mL) + Cdt,(10 µg/mL),e incubados por uma hora a (37°C).

5.4. Viabilidade das fatias de hipocampo

Imediatamente após a incubação com o tratamento, as fatias foram submetidas ao teste com 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) e (05% em HEPES-salina) por 30 min (37°C). O MTT é convertido em formazan roxo que é produto da clivagem do anel tetrazolico pelas mitocôndrias desidrogenases. O formazan foi dissolvido pela adição de DMSO que resultou em um composto colorido com densidade ótica de ($\lambda = 500$ nm) e foi medido em um equipamento de leitura ELISA (LIU et al. 1997)

5.5 Preparação *biventer cervicis* de pintainho

Após o sacrifício com clorofórmio o animal foi fixado a uma placa de dissecação em posição de supino, os músculos foram dissecados e montados nas cubas do banho de órgão semi isolado (AVS Instrumentos, São Carlos/SP, Brasil) para registro miográfico. A preparação nervo-músculo *biventer cervicis* foi montada sobre tensão de 1 g em solução de meio Krebs básico a 37°C, contendo em mM: 120 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl₂, 1,19 MgSO₄, 1,18 KH₂PO₄, 11 glicose e 2,6 NaHCO₃-pH 7,4, aerado constantemente com mistura de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) estabilizando por 30 min antes do uso (RODRIGUES-SIMIONI, et al. 2004)

O estímulo elétrico aplicado foi supramaximal indireto (0,1Hz, 0,2ms, 6-8V) através de eletrodos de platina bipolares conectados a um estimulador elétrico (AVS Instrumentos, São Carlos, SP). Registros de amplitude de força de contração muscular foram registrados por 120 min e respostas evocadas à Ach (acetilcolina) (110 μ M) e KCl (cloreto de potássio) (20 μ M) foram feitas antes e depois da incubação.

Para a situação controle o registro foi feito com estímulo elétrico e solução de Krebs, os tratamentos foram feitos com Cdt (10 μ g/mL), EHON (150 μ g/mL), EHON+Cdt (150 μ g/mL;10 μ g/mL). Todos os experimentos foram feitos com n=5 e gravados por 120 min.

5.6 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média \pm EPM e foram comparados estatisticamente usando o teste ANOVA e seguido do teste “t” de Student. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

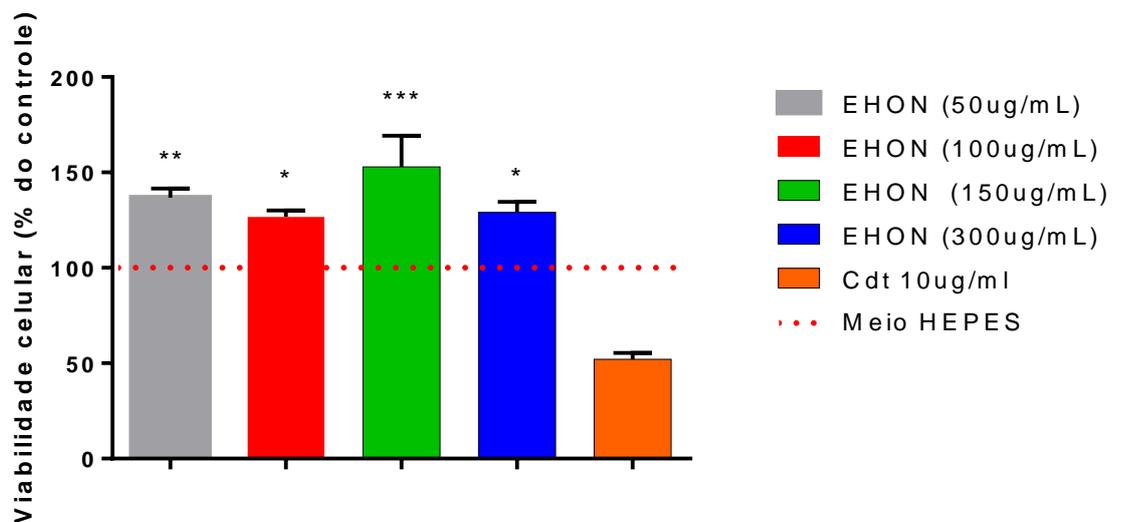
6.1 Ensaio de viabilidade celular

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças ou contra o efeito de venenos em acidentes com escorpiões, abelhas, vespas, e principalmente cobras, vem sendo mostrado tanto como terapia complementar ou alternativa às terapias convencionais (SOARES, et al., 2005). Uma questão importante quando se trabalha com extratos vegetais é decidir a dose a ser utilizadas nos testes.

Para determinar as concentrações do extrato de *O. notata* a serem utilizadas nos ensaios de viabilidade celular e de eletromiografia, foi feito um pré-teste onde as fatias de hipocampo eram expostas a diferentes concentrações do extrato.

No teste de viabilidade celular as concentrações de 150µg/mL e 50µg/mL foram as que demonstraram maior eficiência 70±5% e 40±2% $n = 3$ ($P < 0,05$) respectivamente em relação ao controle apenas com meio, sendo assim, o extrato não demonstrou toxicidade as células hipocampais. Para os testes posteriores foi selecionada a concentração de 150µg/mL.(Figura 4).

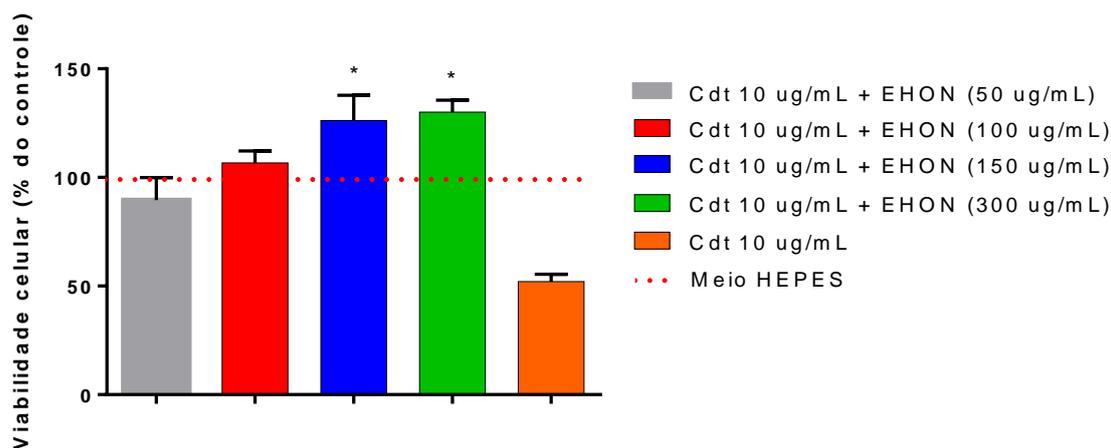
Figura 4: Efeito do extrato hidroalcoólico de *O. notata* (EHON) na viabilidade celular de fatias hipocampais de camundongos. Fatias de hipocampo foram incubadas com EHON (50, 100, 150 e 300 µg/mL) durante 1 hora. A viabilidade celular foi mensurada pelo teste MTT. Valores estão expressos em % do controle que são as fatias não tratadas (valores são significantes ± E. P. M., $n=3$ $P < 0.05$ comparado ao controle).



A incubação do veneno de Cdt na dose de 10 μ g/mL mostrou um decréscimo significativo na viabilidade celular $48 \pm 2\%$, $n = 3$, $P < 0.05$. Quando o extrato foi incubado 30min antes com o veneno de Cdt 10 μ g/mL foi observado um aumento significativo na viabilidade celular quando comparado ao controle com Cdt ($54 \pm 2\%$ e $58 \pm 4\%$, respectivamente para as concentrações de 150 e 300 μ g/mL). O extrato hidroalcoólico de *Ocotea notata* demonstrou eficácia em contrapor a neurotoxicidade induzida pelo veneno da cascavel brasileira sobre o sistema nervoso central de mamíferos (Figura 5).

Segundo Dal Belo et al. (2013) o extrato de *H. Brasiliense* e o flavonoide isolado quercetina tem a capacidade de contrapor os efeitos do veneno de Cdt sobre o sistema nervoso central de camundongos e sistema nervoso periférico de pintainho. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o extrato de *O. notata* também é eficiente contra o veneno de Cdt nestas situações, isso pode estar relacionado com os compostos presentes neste extrato. Garret, et. al (2010) mostraram a presença de quercitina e outros compostos semelhantes a ela no óleo essencial das folhas de *O. notata*, o que pode estar agindo na inibição das PLA₂, levando a diminuição da morte celular.

Figura 5: Efeito do Cdt na viabilidade celular de fatias hipocâmpais de camundongos. Fatias de hipocampo foram incubadas com EHON (150 μ g/mL) na presença de Cdt (10 μ g/mL) durante 1 hora. Controle negativo (controle -) tratado apenas com Cdt (10 μ g/mL). A viabilidade celular foi mensurada pelo teste por MTT. Valores estão expressos em % do controle positivo (controle +) que são as fatias não tratadas (valores são significantes \pm E.P.M., $n = 3$ ($P < 0.05$) comparado ao controle).



6.2 *Biventer cervicis*

Nos testes feitos utilizando a preparação *biventer cervicis* o EHON preveniu eficientemente o bloqueio neuromuscular causado pelo veneno de Cdt ~20%. O tratamento utilizando apenas o EHON não apresentou grande variação com referência ao controle (Figura 6(a)), o bloqueio neuromuscular induzido pelo Cdt pode ser observado no registro eletromiográfico (Figura 6(b)).

Normalmente o bloqueio causado pelo veneno não é reversível após lavagem, no entanto, o extrato foi capaz de permitir a reversão do bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de Cdt, após lavagem. (Figura 7(a)(b)).

Estas informações são significantes por duas razões. Primeiro, devido à grande relevância clínica em reverter um estado de bloqueio muscular normalmente irreversível, e segundo, porque isso sugere que o extrato possa estar atuando na via mecânica de ligação do veneno por uma interação direta com o mesmo.

Este mecanismo é talvez o mais envolvido na ação de produtos fitoquímicos presentes em extratos de plantas (BIONDO et al., 2003), e pode explicar o efeito “protetivo” de plantas quando pré-incubados com veneno antes do teste em estudos biológicos (HASLAM, 1996). O EHON inibiu potencialmente a atividade do veneno crotálico, isso sugere que esse extrato possa ser uma fonte poderosa de inibidores naturais de PLA₂. Flavonóides, quinonoides, polifenóis e terpenóides, junto com outros metabolitos secundários de plantas possuem proteínas que se ligam a enzimas que podem ter propriedade inibitória sobre venenos de serpentes (ASUZU; HARVEY, 2003). Sendo assim, a composição do extrato de *O. notata* pode estar agindo de forma inibitória contra as PLA₂ presentes no veneno de Cdt.

Figura 6: Atividade neutralizante de *O. notata* contra o veneno de Cdt em preparação *biventer cervicis* de pintainho. (a) A figura mostra o efeito inibitório do extrato de *O. notata* (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contra o veneno de Cdt (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Quando o extrato de *O. notata* foi aplicado isoladamente no banho de órgãos não houve alteração significativa na contração muscular em comparação com o controle somente com solução Krebs. No gráfico cada ponto representa a média \pm E.P.M da porcentagem da resposta contrátil em relação ao controle antes da adição dos tratamentos (n=5). (b) Registro eletromiográfico representativo do bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de Cdt (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). * $p < 0.05$.

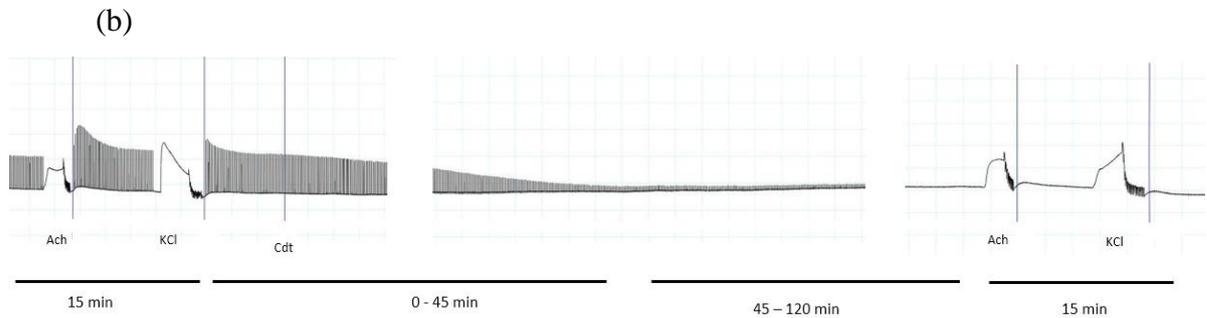
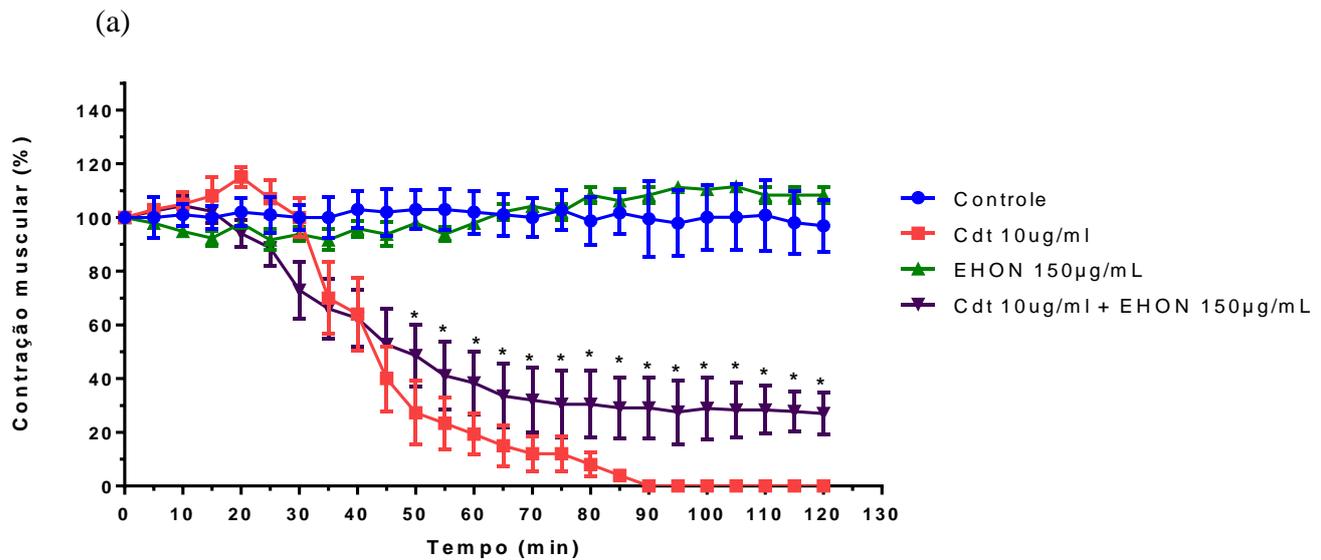
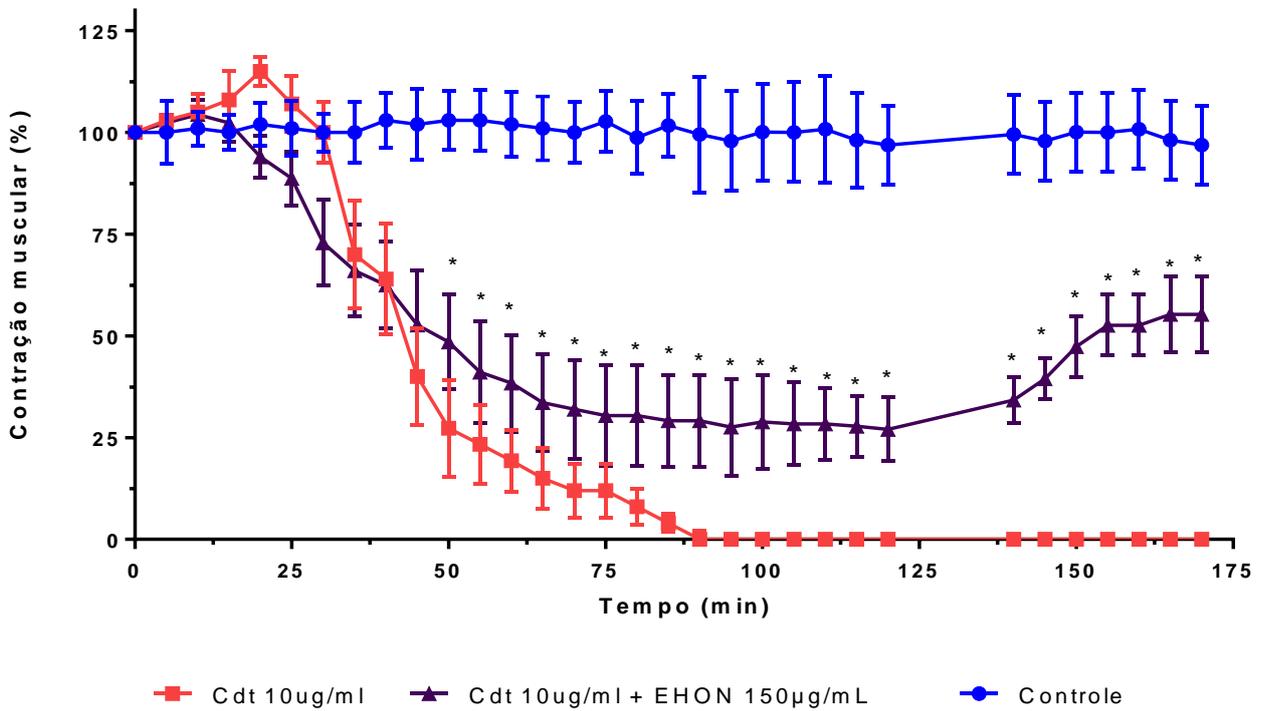
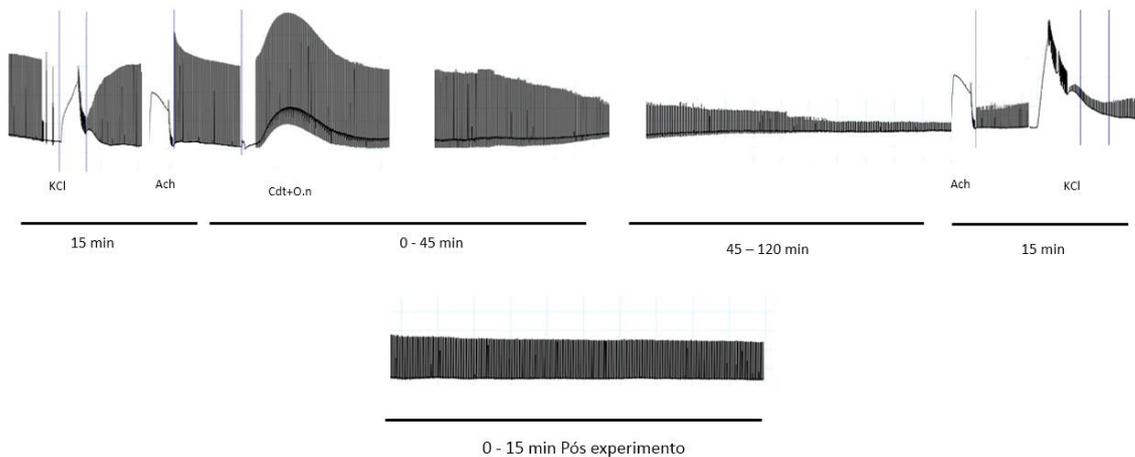


Figura 7: Atividade neutralizante e de reversão do bloqueio neuromuscular de *O. notata* contra o veneno de Cdt em preparação *biventer cervicis* de pintainho. (a) A figura mostra o efeito inibitório do extrato de *O. notata* (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contra o veneno de Cdt (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e reversão do bloqueio neuromuscular após lavagem da preparação. No gráfico cada ponto representa a média \pm E.P.M da porcentagem da resposta contrátil em relação ao controle antes da adição dos tratamentos (n=5).. (b) Registro eletromiográfico representativo do bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de Cdt (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e reversão do bloqueio neuromuscular pós-tratamento com EHON e Cdt. * $p < 0.05$.

(a)



(b)



7 CONCLUSÕES

Com este estudo observou-se que o extrato de *Ocotea notata* não induz neurotoxicidade central e periférica em sistema nervoso de mamíferos e aves. Também foi visto que o mesmo induz neuroproteção contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Essa eficiência em contrapor os efeitos neurotóxicos do veneno crotálico pode estar associada a presença de flavonóides no extrato. Sendo assim, os resultados reforçam o potencial biotecnológico do extrato como um agente antineurotóxico de origem natural.

REFERÊNCIAS

AMORA, D.N., SOUSA, T.M., MARTINS, A.M., et al. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon** 47, 260–264. 2006.

ASUZU, A. L; HARVEY, A. The antisnake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract. **Toxicon**, 43:763-768, 2003.

BARONE, J. M.; FREZZATTI, R.; SILVEIRA, P. F. Effects of N-acetyl-l-cysteine on redox status and markers of renal function in mice inoculated with *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. **Toxicon**. 79, 1–10, mar. 2014.

BARRAVIERA, B. LAMONTE, B. TARKOWSKI. et al. Acute phase reactions including cytokins in patients bitten by *Bothrops* spp. and *Crotalus durissus terrificus* in Brazil, **Journal of Venomous Animals and Toxins**. 1, 11–22, 1995.

BIONDO R, PEREIRA A. M, MARCUSSI S, et al . Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie**, 85:1017-25, 2003.

CAMILLO, M.A., ARRUDA, P.C., et al. Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicon** 39 (6), 843–853. 2001.

CEVAP. **Acidentes ofídicos no Brasil**. Disponível em: <http://www.cevap.org.br/Cont_Default.aspx?cont=EMES>. Acesso em: 15 dezembro de 2014.

DAL BELO C. A., LUCHO A. P. B., VINADÉ, L. et al., “In Vitro Antiophidian Mechanisms of *Hypericum brasiliense* Choisy Standardized Extract: Quercetin-Dependent Neuroprotection”. **BioMed Research International**. Vol. 1, 2013.

GARRETT, R.; ROMANOS, M. T. V.; BORGES, R. M.; et al. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. **Brazilian Journal Pharmacognosy**. 22(2): Mar./Apr. 2012

GARRETT, R; CRUZ, R. A.S.; GUERRA, M. S. et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocotea notata* guiada pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina leach*.

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6. 344-345, 2007.

GARRETT, R; CRUZ, R. A.S.; ROCHA, L. et al. Chemical Composition and Toxicity of *Ocotea notata* (Nees) Mez Essential Oil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. 13:4, 455-459, 2014.

GINSBORG, B. L. WARRINER, J. N.. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. **Br. J. Pharmacol.** 410–411, 1960.

GUTIÉRREZ, J.M., PONCE-SOTO, L.A., MARANGONI, S. et al.. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon** 51, 80–92, 2008.

HASLAM E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J Nat Prod**, 59:205-15,1996.

HERNANDEZ, M., SCANNONE, H., FINOL, H.J., et al. Alterations in the ultrastructure of cardiac autonomic nervous system triggered by crotoxin from rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom. **Exp. Toxicol. Pathol.** 59, 129–137. 2007.

HERNANDEZ-OLIVEIRA, S. ROSTELATO-FERREIRA, S. et al.. Beneficial effect of crotamine in the treatment of myasthenic rats. **Muscle Nerve** 47 (4), 591–593. 2013.

KASTURIRATNE, A. WICKREMASINGHE, A. DE SILVA R. N. et al., “The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths,” **PLoS Medicine**, 5, no. 11, 218, 1591–1604, 2009.

KERKIS, I., SILVA, F. de S., et al. Biological versatility of crotamine – a cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake. **Expert Opin. Investig. Drugs** 19 (12), 1515–1525. 2010.

KROPF, M. S.; QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lista anotada, distribuição e conservação das espécies de lauraceae das restingas fluminenses, Brasil. **Pesquisas, botânica**, 57, 161-180, 2006

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de

Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 53, n.82, p. 59-121, 2002.

LIU, Y. D. PETERSON, KIMURA, A. H. et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, vol. 69, no. 2, pp. 581–593, 1997.

MANCIN, A.C., SOARES, A.M., et al. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**. 36 (12), 1927–1937. 1998

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. **Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 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: 02 de janeiro 2015.

MONTECUCCO, C., GUTIERREZ, J.M., LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.** 65, 2897-2912, 2008.

MOURA, V. M. DE; MOURAO, V. Aspectos do ofidismo no Brasil e plantas medicinais utilizadas como complemento à soroterapia. **Scientia Amazonia**, v. 1, n. 3, 2012.

PINHO, F.O., VIDAL, E. C., BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.** 22(3):162-168, 2000

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta botanica brasílica**, v. 19, n. 3, p. 563-572, 2005.

RODRIGUES-SIMIONI, L., ZAMUNÉR, S.R., COGO, J.C.; et al. Pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops nuuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon** 43, 633–638, 2004.

RUFF, R.L., LENNON, V.A., End-plate voltage-gated sodium channels are lost in clinical and experimental myasthenia gravis. **Ann. Neurol.**43 (3), 370–379. 1998

SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045–1060, 1 jun. 2010.

SIMIONI, L. R., HAWGOOD, B. J. et al. Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions,” **Toxicon**, vol. 28, no. 12, pp. 1479–1489, 1990.

SLOTTA, K.H., 1938. A crotoxina, primeira substância pura dos venenos ofídicos. **Ann. Acad. Brazil Sci.** Rio 10, 195-209.

SOARES, A. M; TICLI, F. K.; MARCUSSI, S. et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 12, no. 22, pp. 2625–2641, 2005

VARGAS, L. S. et al. The intrahippocampal infusion of crotamine from *Crotalus durissus terrificus* venom enhances memory persistence in rats. **Toxicon**, v. 85, p. 52–58, jul. 2014.

VITAL BRAZIL, O., FONTANA, M.D., HELUANY, N.F. Nature of the postsynaptic action of crotoxin at guinea-pig diaphragm end-plates. **J. Nat.Toxins** 9, 33-42. 2000.

WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**. Vol. 375, n. 9708, 77-88, 2010.

ZORNETTA, I. et al. Envenomations by Bothrops and Crotalus snakes induce the release of mitochondrial alarmins. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1526, jan. 2012.