

INFLUÊNCIA DO CHÁ DE *Echinodorus grandiflorus* SOBRE O ASPECTO HEMORRÁGICO EM MÚSCULOS EXPOSTOS AO VENENO DE *Bothrops jararaca*

**Roberto Mussolini dos Santos¹, Renato Aparecido de Souza¹,
Antonio Carlos Guimarães Prianti Júnior¹, Wellington Ribeiro¹,
Walderez Moreira Joaquim², José Carlos Cogo^{1,2}**

¹Universidade do Vale do Paraíba – UniVap, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D,
Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica.

Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova – 12244-400 São José dos Campos (SP).

betobiologo@hotmail.com

²Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN) UniVap.

jccogo@univap.br

Resumo – O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do chá de *Echinodorus grandiflorus* (*E.g.*) sobre os aspectos hemorrágicos do músculo gastrocnêmio medial exposto ao veneno de *Bothrops jararaca* (*B.j.*). Foram utilizados 15 ratos (270-280g) machos Wistar, divididos em 3 grupos experimentais (n=5): **G1 - CONTROLE** -ratos sem nenhuma intervenção experimental; **G2 - VENENO** –ratos que receberam inoculação intramuscular do veneno de *B.j.* (120ug/0,05 ml), sem o pré-tratamento com o chá; **G3 - VENENO + CHÁ** –ratos que receberam inoculação intramuscular do veneno de *B.j.* (120ug/0,05 ml) e foram pré-tratados com chá de *E.g.* (30 g/100 ml de água por 5 dias). Recebendo reforço do chá por via oral (gavagem) de 2ml antes da inoculação do veneno. Os músculos foram retirados e processados seguindo o protocolo de montagem com H.E para análise histológica.. Foi observada para o grupo **G1**, integridade das paredes dos vasos sanguíneos com hemácias dentro dos vasos. Já os grupos **G2** e **G3** apresentaram rompimento vascular e extravasamento de hemácias para o interstício (hemorragia). Conclui-se que nestas doses, o tratamento com o chá não promoveu proteção contra a hemorragia.

Palavras-chave: *Equinodorus grandiflorus*, *Bothrops jararaca*, hemorragia.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas e Farmacologia

Introdução

Os venenos ofídicos são uma mistura complexa de inúmeras proteínas enzimáticas e tóxicas, caracterizadas como enzimas proteolíticas, miotoxinas, metaloproteases hemorrágicas, neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, entre outras [1]. Desta forma, o envenenamento por cobras gera um proeminente dano tecidual, caracterizado por hemorragia, edema, necrose, alterações no sistema de coagulação do sangue e efeitos neurotóxicos sistêmicos [2, 3]. Os efeitos sinérgicos de enzimas e toxinas ativas presente nos venenos são responsáveis por este complexo quadro patológico [2, 3, 4].

A procura de inibidores naturais do veneno é fundamental para complementar a terapia tradicional, a qual enfoca particularmente a neutralização do dano tecidual local [5]. Os extratos das plantas, são uma fonte rica de inibidores naturais e combinações farmacológicas ativas, sendo utilizados para antagonizar a atividade de venenos e toxinas [6, 7]. A literatura reporta a utilização de diversos extratos vegetais para inibir a atividades dos venenos de cobras, tais como: *Casearia sylvestris*, *Eclipta prostrata*,

Mimosa pudica, *Tabernaemontana catharinensis*, *Mandevilla velutina* [8, 9 e 10].

O chapéu-de-couro, como é conhecido vulgarmente a *Echinodorus grandiflorus* (*E.g.*), é amplamente utilizado pela população por ser tradicionalmente conhecido como diurético, anti-reumático e antiinflamatório. Além disto, poderia ser utilizado para regulação sanguínea do ácido úrico, alterações dermatológicas [11] e contra picadas de cobras [12]. Apesar das folhas desta planta serem muito comercializadas popularmente, os estudos científicos envolvendo esta espécie são imprecisos e pouco consistentes [13, 14].

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-hemorrágica de *Echinodorus grandiflorus* sobre o veneno de *Bothrops jararaca* exposto ao músculo gastrocnêmio medial de ratos Wistar. O estudo teve como instrumento de avaliação dos possíveis efeitos do tratamento instituído, cortes histológicos do músculo estudado.

Material e Métodos

Comitê de Ética: O presente trabalho foi desenvolvido de acordo com os princípios de

manuseio e cuidado com animais preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Univap (Protocolo–(L051/2005/CEP).

Veneno: O veneno de *Bothrops jararaca* (*B.j.*) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Carlos Cogo do Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN), localizado na Univap. Sua extração foi feita a partir de serpentes adultas da região do Vale do Paraíba do solário 4 no ano de 2002.

Animais: Foram utilizados 15 ratos Wistar (280 ± 12,5g) machos, adultos jovens (10-12 semanas de idade), divididos igualmente em 3 grupos experimentais (ver abaixo).

Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de contenção no Biotério de Passagem do Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, em condições de temperatura adequadas. Todos os animais tiveram acesso à ração peletizada (Labcil®) e água *ad libitum*.

Preparação do chá: As folhas de *E.g.* foram coletadas no CEN (Centro de estudos da Natureza) no período da manhã. A preparação do chá consistia na infusão de 100ml de água fervendo em 30g de folhas trituradas. Após resfriada, esta era coada e oferecida aos animais no bebedouro durante 5 dias sendo que seu volume medido e repostado diariamente.

Modelo Experimental:

GRUPO 1: Os animais deste grupo foram tratados com água durante 5 dias. No dia do experimento, foi injetado no músculo gastrocnêmio medial 0,05ml de solução salina 0,9%. Duas horas antes do procedimento cirúrgico para a retirada do músculo, os ratos deste grupo receberam 2 ml de água por via oral (gavagem).

GRUPO 2: Os animais deste grupo foram tratados com água durante 5 dias. No dia do experimento, foi injetado no músculo gastrocnêmio medial 120 µg/0,05ml de veneno de *B.j.* Duas horas antes do procedimento cirúrgico para a retirada do músculo, os ratos deste grupo receberam 2 ml de água por via oral (gavagem).

GRUPO 3: Os animais deste grupo foram tratados com chá durante 5 dias. No dia do experimento, foi injetado no músculo gastrocnêmio medial 120 µg/0,05ml de veneno de *B.j.* Duas horas antes do procedimento cirúrgico para a retirada do músculo, os ratos deste grupo receberam reforço de 2 ml de chá por via oral (gavagem).

Coleta tecidual e procedimentos histológicos: Os animais foram anestesiados com Ketamina (0,6ml/Kg) e Xilazina (0,10 ml/Kg). Após realizou-se injeção intracardíaca de KCl. O músculo gastrocnêmio medial foi exposto através de

procedimento cirúrgico, isolado e recortados em cubos de 3 mm. Logo após, foi fixado em formol 4% por período de 24 horas. Em seguida foi processado para análise histológica de rotina.

Cortes transversais e longitudinais de 5µm de espessura do músculo foram realizados em micrótomo Espences 820 e montados sob lâmina para microscopia e corados em Hematoxilina e Eosina. Os cortes musculares foram analisados em microscópio óptico (Nikon-eclipse E200).

Resultados

A Figura 1 mostra corte transversal do músculo do grupo controle (G1) onde pode-se observar as fibras musculares longitudinais, núcleos periféricos e com ausência de hemácias nos espaços intersticiais.

As Figuras 2 e 3 mostram rompimento de vasos com extravasamento das hemácias da luz do vaso para o interstício das fibras (hemorragia).

Verificamos que a quantidade de hemácias fora dos vasos no Grupo 2 é semelhante às quantidade encontrada no grupo 3 tratados com o chá de *E.g*

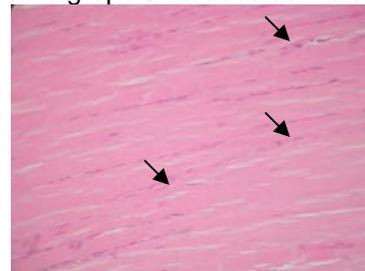


Figura 1: Corte longitudinal do músculo gastrocnêmio medial controle: fibras normais com núcleo periférico (setas). H.E (400x)

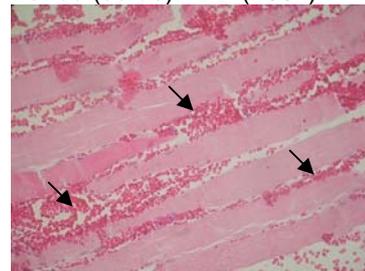


Figura 2: Corte longitudinal do músculo gastrocnêmio medial: grupo inoculado com veneno de *B.j.* (G2). Verifica-se muitas hemácias no espaço intersticial (setas). H. E. (400X).

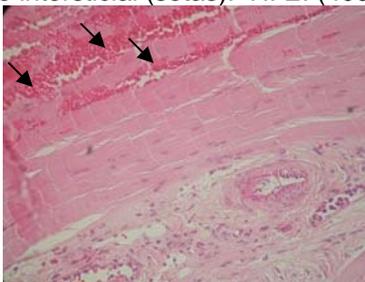


Figura 3: Corte longitudinal do músculo gastrocnêmio medial: grupo inoculado com veneno de *B.j.* e tratado com chá de *E.g.* (G3). Verifica-se muitas hemácias no espaço intersticial (setas). H. E. (400X).

Conclusão

Neste estudo foi demonstrado que nas condições experimentais instituídas, que a intensidade da hemorragia no músculo gastrocnêmio dos animais inoculados com veneno de *B.j.* e tratados com o chá de *Echinodorus grandiflorus* foi aparentemente a mesma daqueles tratados apenas com água e inoculados com veneno de *B.j.*

Novas pesquisas aumentando a concentração do chá deverão ser realizadas.

Referências

[1] MEIER, J.; STOCKER, K.F. Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. p. 367-412, 1995.

[2] OWNBY, C.L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. **Handbook of Toxicology, Marcel Decker**. p. 601-654, 1990.

[3] BJARNASON, J.B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.** V.62, p. 325-372, 1994.

[4] GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, M.; DÍAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**. V.33, p. 19-29, 1995.

[5] 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.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comp. Biochem. Physiol.** V.127, p. 21-31, 2000.

[6] 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* extracts and constituents. **Toxicon**. V.32, p. 595-602, 1994

[7] MELO, P.A.; OWNBY C.L. Ability of wedelolactone, heparin and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotalid venoms and their PLA₂ myotoxins. **Toxicon**. V.37, p.199-215, 1999

[8] MAHANTA, M.; MUKHERJEE, A.K. Neutralization of lethality, myotoxicity and toxic enzymes of *Naja kaouthia* venom by *Mimosa pudica* root extracts. **J. Ethnopharmacol.** V.75, p.55-60, 2001.

[9] BATINA, M.F.C.; CINTRA, A.C.O.; VERONESE, E.L.G.; LAVRADOR, M.A.S.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; DIAS, D.A.; FRANÇA, S.C.; SAMPAIO, S.V. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. **Planta Medica**. V. 66, p.424-428, 2000.

[10] CALIXTO, J.B.; NICOLAU, M.; YUNES R.A. A selective antagonist of bradykinin action from a crude extract of *Mandevilla velutina*. Effect on isolated rat uterine smooth-muscle. **Bras. J. Med. Biol.** V. 8, p.728-728, 1985.

[11] TESKE, M.; TRENTINI, A.M. Compêndio de Fitoterapia. **Curitiba: Herbarium** 2. ed., p 317, 1995.

[12] BRÛNING, J. A saúde brota da natureza. **Curitiba: Expoente**, 19. ed., p.400, 2000.

[13] KISSMANN, K.G. Plantas infectantes e nocivas. **São Paulo: BASF**. V 1. p.603, 1991.

[14] RATES, S.M.S. Controle de qualidade de matérias-primas vegetais e Fitoterápicos no RS: situação atual e perspectivas. **Porto Alegre: Faculdade de Farmácia, UFRGS**, p.26, 1993.