

## AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-EDEMATOGÊNICO DE *Vernonia scorpioides* (PIRACÁ) E SUAS FRAÇÕES FRENTE AO VENENO DE *Bothrops fonsecai*

**Silva GC<sup>\*1</sup>, Rabelo NS<sup>1</sup>, Paula AA<sup>2</sup>, Joaquim WM<sup>2</sup>, Barbosa AM<sup>2</sup>, Arakawa NS<sup>2</sup>, Cogo JC<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências da Saúde, Curso Enfermagem

Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP - Brasil glaucia\_321@yahoo.com.br; natan\_rabelo@hotmail.com

<sup>2</sup> Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D - UNIVAP - Brasil

Fone:+55 12 3947 1106; fisioaap@gmail; wal@univap.br; abarbosa01@yahoo.com.br niton@univap.br; jccogo@univap.br;

**Resumo-** As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos no Brasil. O veneno botrópico induz efeitos locais caracterizados por edema, hemorragia, necrose e dor intensa, além de efeitos sistêmicos graves. Embora a soroterapia seja, ainda, a melhor alternativa para o tratamento dos efeitos sistêmicos do envenenamento, dificilmente neutralizam as reações locais. O objetivo da presente pesquisa foi de estudar a ação antiofídica do extrato hidroalcoólico e frações das folhas de *Vernonia scorpioides* frente ao efeito edematogênico do veneno bruto de *Bothrops fonsecai*. O extrato hidroalcoólico foi preparado a partir das folhas e as frações obtidas através de fracionamento por partição seqüencial utilizando solventes em polaridade crescente: diclorometano, acetato de etila e n-butanol. A eficiência do extrato e das frações foram testados em ratos *Wistar* (150 a 200g) para verificação dos efeitos diuréticos, consumo do extrato e frações, quantidade de fezes e ação anti-edematogênica. Os resultados obtidos foram significativos quanto à redução do edema de pata, assim, a administração oral do extrato e frações de *V. scorpioides* em ratos apresentou efeito anti-edematogênico frente ao veneno de *B. fonsecai*.

**Palavras-chave:** Inflamação, Fitoterapia, *Vernonia scorpioides*, *Bothrops fonsecai*

**Área do Conhecimento:** Enfermagem

### Introdução

Autoridades e departamentos de saúde vêm desprendendo uma atenção especial para o uso de plantas medicinais (SILVEIRA, BANDEIRA, ARRAIS, 2008). Essa tendência aumentou significativamente nos últimos anos, devido à estudos sobre as ações antiinflamatórias, antifúngicas, cicatrizantes e outras diferentes razões e em diferentes setores, utilizando-se para isto, plantas (YUNES, PEDROSA, FILHO, 2001).

Atualmente extratos vegetais tornam-se uma excelente alternativa farmacológica devido à atividade de seus componentes que podem atuar como, por exemplo, anti-venenos no envenenamento ofídico (OLIVEIRA, 2005).

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes promovidos por serpentes na América do Sul, os quais ocasionam normalmente efeitos sistêmicos graves (SANTOS et al., 2003). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, ocorrem entre 19 mil e 22 mil acidentes ofídicos por ano (PINHO, PEREIRA, 2001), e obtém um índice de 15 casos notificados para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2005). A soroterapia é a única medida terapêutica efetiva para os acidentes promovidos pelas serpentes. Porém, os anti-venenos, apesar de sua ação eficaz sobre o quadro sistêmico, raramente

neutralizam as reações locais. Segundo Matos (2003), a cicatrização lenta das lesões é uma característica significativa do envenenamento botrópico, justificando-se pela isquemia local, sendo o tratamento ineficaz à ação do soro específico.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi de verificar a ação antiofídica da planta *Vernonia scorpioides* e suas frações obtidas frente ao quadro clínico de edema promovido pelo veneno de *Bothrops fonsecai*.

### Metodologia

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D), da Universidade do Vale do Paraíba, na cidade de São José dos Campos, SP.

**Veneno:** O veneno da serpente *Bothrops fonsecai* foi fornecido pelo Serpentário do CEN (Centro dos Estudos da Natureza) da UNIVAP. O veneno liofilizado foi mantido sob refrigeração a 4°C, sendo diluído em solução salina (0,9%) somente no momento do uso.

**Animais:** Foram utilizados ratos *Wistar*, pesando entre 150 e 200 g, fornecido pelo Laboratório Anilab (Campinas – SP). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas em

temperatura local controlada (22 à 28 °C) e humidade constante (24°C – 60%), com ciclo claro – escuro (12/12 horas), onde foram monitorados diariamente recebendo água e ração *ad libitum*.

**Protocolo de Ética:** A condução científica desta pesquisa seguiu as normas e registros da resolução CNS 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sendo realizada somente após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVAP sob o nº A037/CEP/2009.

**Protocolo de Eutanásia:** Os animais foram anestesiados com 10 mg/Kg de Xilazina (Virbaxyl 2% injetável; 0,1 mg/Kg i.p.) + 100 mg/Kg de Ketamina (Dopolen injetável; 1 mL/Kg i.p.). Em seguida, sob o efeito do anestésico, foi administrada overdose de Cloreto de Potássio a 10% (intracardiaco) (FLECKNELL, 2000).

**Edema de pata:** A habilidade do veneno bruto de *Bothrops fonsecai* para indução do edema foi estudada em ratos. 50 µL de solução salina estéril (0,9 %) com veneno 0.5 µg/pata, foi injetada via subplatar na pata direita. A pata esquerda recebeu igual volume de solução salina estéril somente (controle).

**Grupos e tratamento:** Para verificar os parâmetros como consumo de água, extrato e frações, produção de urina, comida ingerida, produção de fezes os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas divididos aleatoriamente (n=4). Foi avaliado durante 5 dias o consumo de água ou chá do extrato bruto ou frações, excreção de urina, alimento ingerido e fezes produzidas.

O Grupo Controle e o Grupo Veneno receberam somente água; o Grupo Extrato Bruto recebeu o chá do extrato bruto (1g/kg), o Grupo Acetato recebeu o chá da fração Acetato (1g/kg) e o Grupo Butanol recebeu o chá da fração Butanol (1g/kg). No quinto dia, o Grupo Controle recebeu injeção de solução salina estéril (0,9%) em ambas as patas traseiras. Nos demais grupos foram injetados (0.5 µg/pata) do veneno.

**Preparo do extrato e frações:** A coleta de *Vernonia scorpioides* foi realizada no viveiro de plantas medicinais da Universidade do Vale do Paraíba no CEN - Centro de Estudos da Natureza – Univap. O material vegetal foi colocado em estufa de secagem por um período de 10 dias à temperatura controlada inferior a 40 °C. Após a dessecação total, o material foi moído em moinho elétrico de facas. A planta pulverizada foi pesada (20g), acondicionada em frasco âmbar e mantida à temperatura ambiente em local seco, arejado e sem iluminação.

O extrato hidroalcoólico foi preparado em percolador de aço inoxidável com capacidade para 5000 ml, segundo o processo da Farmacopéia Brasileira 1959. Foi mantido em contato com álcool etílico 70%, permanecendo-se durante o

período de 7 dias onde foi feita a primeira extração. Adicionou-se ao resíduo à mesma quantidade de álcool etílico (70%) e a mistura foi agitada, deixada em contato por mais quatro dias, totalizando duas extrações.

O extrato hidroalcoólico foi armazenado em geladeira (10° C) por 2 dias, iniciando-se o processo de concentração através de um rotaevaporador Buchi R-114 com temperatura inferior a 60 °C por 2 horas e quatro dias depois mais 1 hora. Utilizou-se um concentrador à 60° C por 2 horas e posteriormente levado à estufa onde permaneceu por 25 dias.

O extrato hidro-etanólico reduzido foi retomado em MeOH:H<sub>2</sub>O (8:2) e transferido para um funil de separação para o fracionamento por partição utilizando-se solventes em gradiente crescente de polaridade: diclorometano, acetato de etila e n-butanol (4 x 200 ml cada). Foi adicionada pequena quantidade de cloreto de sódio para evitar emulsão entre as fases.

A partir desse processo foram obtidas três frações orgânicas e uma fração aquosa remanescente que foram concentradas à secura em evaporador rotatório.

**Preparo do Chá:** Foi utilizado 1 g/kg do extrato e das frações de *V. scorpioides*, diluído em 70 ml de água e feito a diluição. O preparo do chá foi realizado diariamente e oferecido aos animais nas gaiolas metabólicas.

**Procedimento Experimental:** Após o tratamento com a água, o chá ou as frações e a administração do veneno, o edema foi mensurado e expresso em porcentagem. O pico do edema foi mensurado no tempo 120 minutos. O edema foi expresso em porcentagem do aumento do volume da pata direita (veneno) com relação à pata esquerda (controle).

**Método Estatístico:** Para todos os dados obtidos foram realizados cálculos de média e erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste de variância ANOVA com pósteste de Turkey-Kramer para comparação múltipla onde foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## Resultados

Foram processados 20g de folhas de *Vernonia scorpioides* e obteve-se 5,5g de extrato bruto. O rendimento de cada fração foi determinado em relação à massa de folhas secas maceradas (Tabela 1).

Foi observado que a produção de urina permaneceu a mesma nos grupos controle, veneno, extrato bruto e fração acetato, porém o consumo de água foi maior na fração acetato, mostrando-se estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Quanto à produção de

urina, podemos verificar diferença estatística no grupo fração butanol, entretanto não se pode afirmar que o mesmo apresentou atividade diurética, uma vez que houve aumento de consumo de água por este grupo (Figura 2).

Observou-se que na Figura 3, que tanto no extrato bruto como nas frações acetato e butanol, ambos inibiram a formação de edema de pata provocada pela injeção do veneno botrópico.

Durante as avaliações dos parâmetros fisiológicos, pode-se observar que em relação ao peso o grupo controle diminuiu em média 4%, o grupo tratado com fração acetato aumentou 1,7%, o grupo butanol diminuiu 4% (exceto um animal que apresentou aumento de peso), o grupo extrato bruto apresentou variações entre aumento e redução de peso impossibilitando avaliações estatísticas. As comparações citadas acima se referem ao primeiro e último dia da semana de tratamento (dados não mostrados).

1) Obtenção do extrato e fracionamento:

Tabela 1- Rendimento das frações do extrato hidroalcoólico de *Vernonia scorpioides*.

Extrato	Solvente	Rendimento	%
Bruto	-	-	-
Fração 1	Acetato	1.770mg	32,2
Fração 2	Butanol	4660mg	81,1

2) Parâmetros metabólicos:

A) Consumo de Ração e Produção das Fezes:

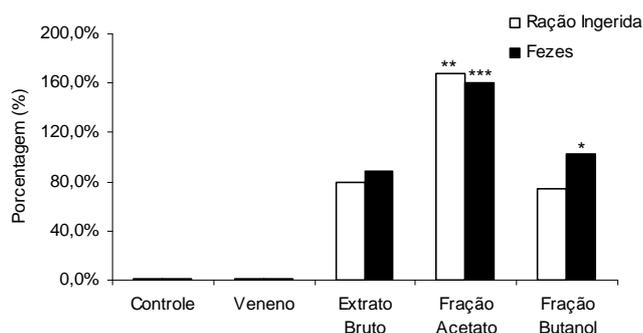


Figura 1: Porcentagem de ração ingerida e produção de fezes pelos grupos de animais em relação ao grupo Controle, onde foi disponibilizado 60g diariamente. ANOVA, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

B) Água ou Chá Ingeridos e Urina Excretada:

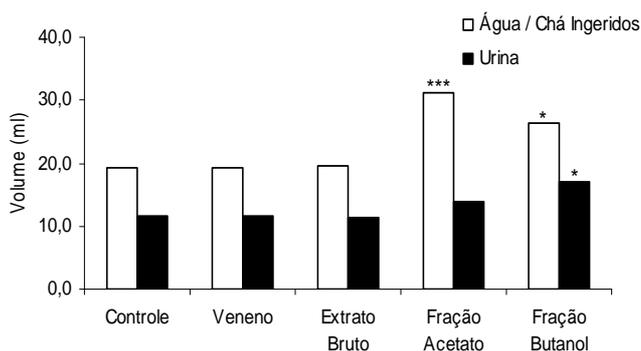


Figura 2: Volume de água, chá de extrato bruto ou frações de *V. scorpioides* ingerido pelos animais e de urina excretada. ANOVA, \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.

3) Edema de pata:

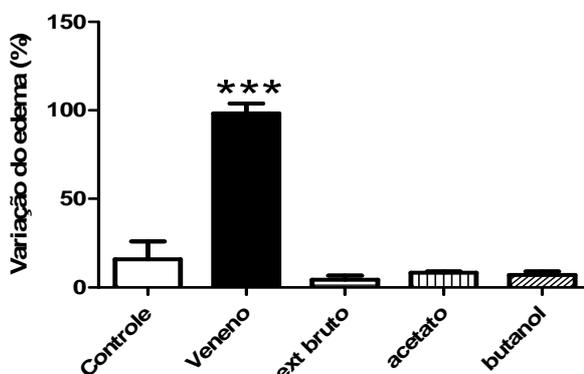


Figura 3: Neutralização pelo extrato de *V. Scorpioides* e suas frações no edema de pata pelo veneno *Bothrops fonsecai* rato. Foi utilizado 1 g/kg do extrato e solução salina à 0,9 % na pata controle. ANOVA, \*\*\*p<0,001.

Discussão

Os parâmetros fisiológicos estudados nos mostram o consumo de água e chá elaborado com as frações obtidas, assim como a quantidade de comida ingerida, formação de fezes e formação de urina.

De acordo com os nossos resultados, o grupo de animais tratados com a fração Acetato apresentou maior consumo de ração e conseqüentemente maior produção de fezes em relação ao grupo controle e aos outros grupos. Esse aumento se deve a uma possível ação estimulante de apetite desta fração. A fração Butanol não apresentou aumento significativo no consumo de ração, embora houvesse um aumento na produção de fezes.

Os dados mostram que o extrato Bruto e frações de *Vernonia scorpioides* não apresentaram capacidade diurética nos animais. Não foram encontrados na literatura dados

semelhantes aos parâmetros fisiológicos aqui estudados à respeito dessa planta.

Em relação ao peso dos animais, o grupo tratado com a fração Acetato apresentou um aumento significativo comparando-se ao grupo Controle, isso se deve à maior ingestão de chá e ração pelo grupo, que apresentou um aumento relevante do apetite. Esse aumento do peso pode estar relacionado à massa gorda, massa magra ou retenção líquida do animal, o que não foi verificado no presente trabalho.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o extrato bruto de *V. scorpioides* e suas frações, ingerido durante 5 dias, reduziu o processo inflamatório agudo de edema de pata de ratos, quando administrado o veneno de *B. fonsecai* no tempo de 120 minutos.

O aumento da permeabilidade vascular é a primeira alteração que ocorre na microvasculatura durante a inflamação, levando a um extravasamento de fluido rico em proteínas para o interstício gerando a formação de edema (ZAMUNER, 2002). A formação de edema é também uma característica comum da resposta inflamatória cutânea e é dependente do sinergismo entre mediadores que aumentam a permeabilidade vascular e daqueles que aumentam o fluxo sanguíneo (WILLIAMS e PECK, 1977). Na administração do veneno *B. fonsecai*, o extrato de *V. scorpioides* e suas frações inibiram o edema de forma significativa no tempo de 120 minutos.

Awe et al (1999), demonstrou que a administração de 100 e 200 mg/kg do extrato metanólico de *V. amygdalina* protegeu em 40 e 50% contra trombose provocada e isto pode estar relacionado à habilidade de inibir a agregação plaquetária.

Ainda estudos notificaram a presença de inibidores efetivos do início da oxidação da atividade poliformonuclear dos leucócitos em extrato de *V. cinérea* Less, sendo que este efeito pode estar relacionado com a atividade antiinflamatória relatada para a espécie pela medicina tradicional (ABEYSEKERA et al, 1999).

Em trabalho realizado por Dreux (2005), a administração intraperitoneal do extrato de *V. scorpioides* em ratos apresentou efeito inibitório nos modelos experimentais de inflamação aguda de edema de pata induzido por carragenina e histamina. Além disso, a administração intraperitoneal do extrato de *V. scorpioides* em camundongos se mostrou eficaz em reduzir o edema causado pelo veneno de *B. jararaca* em 50,9 nos primeiros 60 minutos e 67,8% em 120 minutos nos tratamentos realizados com o extrato antes da indução do edema. (FERRARI, 2006)

De acordo com Borges et al (2000), o extrato de *Caeseria syvestris* reduziu o edema induzido

pelo veneno de *B. moojeni*, redução esta de 50% na forma de edema quando utilizado veneno incubado com extrato.

Neste trabalho, *V. scorpioides* e suas frações apresentam ações anti-edematogênicas, corroborando com outros resultados na literatura (DREUX, 2005; FERRARI, 2006), apresentando resultados semelhantes a outras espécies vegetais frente à venenos de serpentes do gênero *Bothrops*.

## Conclusão

Através dos resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se concluir que:

Os parâmetros fisiológicos nos mostram que os animais aceitaram o extrato bruto de *Vernonia scorpioides* e suas frações, havendo uma interferência direta nos grupos tratados com frações de Acetato e Butanol em seus hábitos alimentares e fisiológicos, dados estes que nos mostram uma possível característica estimulante de apetite no primeiro.

Não houve efeito diurético tanto do extrato bruto da *V. scorpioides* como nas suas frações utilizadas.

Não houve ganho e nem perda peso significativo estatisticamente nos grupos avaliados.

A administração oral do extrato e frações de *Vernonia scorpioides* em ratos apresentou efeito anti-edematogênico frente ao veneno de *Bothrops fonsecai*, com redução de edema no tempo de 120 minutos.

## Referências

- ABESEYKERA, A.M. et al. Inhibition of chemiluminescence generated by zimosan activated polymorphonuclear leucocytes by phenolic constituents of *Vernonia cinérea*. **Fitoterapia**, vol. 70 pp. 317-319, 1999.
- AWE, S.O. et al. Cathartic effect of the leaf extract of *Vernonia amygdalina*. **Fitoterapia**, v. 70, pp 161-165, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6<sup>a</sup>. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816p.
- MATOS L.G. et al. Atividades analgésicas e/ou antiinflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillarie (manacá). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.13, supl., p. 15-16, 2003.

- OLIVEIRA, C.Z. et al. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Berutinia forticata* against snake venoms. **Journal of Ethnoph.** v. 98; pp. 213-216, 2005.

- PINHO F.M.O.; PEREIRA I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 47, n.1, 2001. p. 24-29.

- SANTOS M.M.B.; MELO M.M.; JACOME D.O.; FERREIRA K. M.; HABERMEHL G. G. Avaliação das lesões locais de cães envenenados experimentalmente com *Bothrops alternatus* após diferentes tratamentos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 55, n. 5, 2003.

- SILVEIRA P.F., BANDEIRA M.A.M.; ARRAIS P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev. bras. farmacogn.** v.18, n.4 Oct./Dec. 2008, p 618-626.

- YUNES, A.R.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade de desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil. **Química Nova.** v. 24, n.1, 2001. p.146-152.

- ZAMUNER, S.R. Mecanismos envolvidos no recrutamento e 4 ativações leucocitárias e o papel dos neutrófilos nos efeitos locais induzidos pelos venenos da serpente *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* e na regeneração após a injeção desses venenos, 2002. 120p. **Tese (Doutorado em farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.** São Paulo, 2002.