

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nicole Moreira Farrapo

**Efeito antibotrópico da *Plathymenia reticulata* Benth sob o
parâmetro da junção neuromuscular**

Sorocaba/SP
2010

Nicole Moreira Farrapo

**Efeito antibotrópico da *Plathymenia reticulata* Benth sob o
parâmetro da junção neuromuscular**

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco.

Sorocaba/SP

2010

Dedico este trabalho aos meus pais, Gilmar e Eunice, pelo amor, carinho, atenção e dedicação que sempre me deram e ao meu namorado, Maicon, pela paciência, companheirismo, por estar presente em minha vida em todos os momentos e por me fazer tão feliz!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minhas irmãs, Cibele e Samira, que sempre me ajudaram, em todos os momentos que mais precisei. A Deus pela minha vida.

Ao meu namorado Maicon, por ser tão especial e presente em minha vida, por ser sempre compreensível e companheiro em todos os momentos que mais precisei.

À Universidade de Sorocaba (Uniso), por oferecer suas instalações, para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, por todos os ensinamentos, pela dedicação e ajuda na confecção deste trabalho e principalmente por acreditar em meu potencial.

A todo corpo docente, que contribuíram para minha formação.

Aos colaboradores, Profa. Ms. Magali G. Silva (Uniso), Prof. Dr. Cháriston A. Dal Belo (UFT), Prof. Dr. Márcio G. dos Santos (UFT), Prof. Dr. José C. Cogo (Univap), Profa. Dra. Eliana A. Varanda (Unesp Araraquara), pela ajuda indispensável no desenvolvimento do trabalho.

Ao apoio financeiro, FAPESP, CAPES.

Ao meu patrão Carlos e amigos de trabalho, Luciana e Leonardo.

À minhas amigas Gleidy e Karine, pelo companheirismo, dedicação e grande ajuda no decorrer do trabalho.

À minhas amigas Lia e Luana, durante essa jornada.

Ao estagiário Renato, durante a utilização dos Laboratórios.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

RESUMO

Entre os 20.000 acidentes ofídicos anuais notificados no Brasil, o gênero *Bothrops* representa cerca de 90%. O veneno bruto da serpente *Bothrops jararacussu* (Bjssu), apresenta uma ação proteolítica que causa uma severa mionecrose tanto *in vivo* como *in vitro* e bloqueio neuromuscular. Estudos *in vitro* realizados anteriormente com o extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata* Benth (*P. reticulata*), demonstraram o efeito antibotrópico da planta contra o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de Bjssu. Frente ao exposto os objetivos desse estudo foram: 1) avaliar o efeito farmacológico de extratos de diferentes polaridades (hexano, EHEX; diclorometano, EDM; acetato de etila, EAET; e metanol, EMET), obtidos das cascas de *P. reticulata*, contra o bloqueio neuromuscular irreversível induzido pelo veneno bruto de Bjssu, em preparações isoladas nervo frênico-diafragma de camundongos; 2) análise histológica dos músculos diafragmas, expostos ao estudo farmacológico; 3) avaliar o índice de mutagenicidade do extrato hidroalcoólico da *P. reticulata*, através do Teste de Ames, utilizando cepas mutantes de *Salmonella typhimurium*. O extrato diclorometano (EDM) foi o mais eficiente ($92 \pm 6,2\%$) em impedir a paralisia neuromuscular induzida pelo veneno bruto de Bjssu em comparação aos outros extratos (* $p < 0,05$), resultando em uma resposta muito próxima à das preparações incubadas com Tyrode (controle). O dano morfológico induzido pelo efeito miotóxico do veneno de Bjssu, bem como o efeito neutralizante do extrato EDM, foram quantificados através de análise histológica dos músculos, mostrando que o EDM reduziu em 58,2% a mionecrose causada pelo veneno. O extrato hidroalcoólico de *P. reticulata* (EHPr) mostrou-se mutagênico para a linhagem bacteriana de *Salmonella typhimurium* TA98 e apresentou indícios de mutagenicidade para as linhagens TA97a e TA102. Avaliando os resultados em conjunto conclui-se que a *P. reticulata* apresenta ação antibotrópica *in vitro* e potencial antitumoral pela sua capacidade mutagênica.

Palavras-chave: Veneno de *Bothrops jararacussu*. Miotoxicidade. Mutagenicidade. Junção neuromuscular. Neurotoxicidade. *Plathymenia reticulata* Benth.

ABSTRACT

Among the snakebite accidents registered in Brazil, 90% of 20.000 accidents per year are caused by *Bothrops* genus. The *Bothrops jararacussu* (Bjssu) venom has an intense proteolytic activity that induces a severe myonecrosis either *in vivo* as *in vitro* (irreversible neuromuscular blockade). The aim of this study was to evaluate the pharmacological effect of extracts obtained from *Plathymenia reticulata* Benth (*P. reticulata*) barks using solvents of different polarities (hexane, EHEX; dichloromethane, EDM; ethyl acetate, EAET; and methanol, EMET), against the irreversible neuromuscular blockade induced by Bjssu venom on mouse phrenic nerve-diaphragm preparation, and to evaluate the mutagenicity (Ames Test) of *P. reticulata* hydroalcoholic extract. Among the extracts, EDM was the most efficient (92 ± 6.2 %) against the paralysis induced by Bjssu paralysis (* $p < 0.05$), similar the control (Tyrode solution). The morphological damage induced by the venom as well as the neutralizing effect of EDM was quantified in the muscles-treated using conventional histological analysis. EDM avoided in 58,2% the venom myonecrosis evolution. The *P. reticulata* hydroalcoholic extract showed be mutagenic for TA98 and also revealed mutagenicity traces for TA97a and TA102 *Salmonella typhimurium* lines. In conclusion, *P. reticulata* has an *in vitro* antibothropic action and antitumoral potential by its mutagenic ability.

Keywords: *Bothrops jararacussu* venom. Myotoxicity. Mutagenicity. Neuromuscular junction. Neurotoxicity. *Plathymenia reticulata* Benth.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.....	20
Figura 2	<i>Bothrops jararacussu</i>	23
Figura 3	Casca da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth.....	26
Figura 4	Pó das cascas da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth.....	26
Figura 5	Soxhlet, contendo cartucho de papel filtro com pó da casca da <i>P. reticulata</i>	31
Figura 6	Lâmina pronta para contagem. Corte transversal de preparação incubada com extrato EDM (0,4mg/mL), corada com Hematoxilina e Eosina. Objetiva 40X.....	36
Figura 7	Caracterização do padrão utilizado para a contagem e tipos de células normais, vaso sanguíneo, lesões delta, edema, região de hipercontração, células <i>ghost</i> e junção neuromuscular.....	37
Figura 8	Representação esquemática das etapas do estudo.....	39
Figura 9	Curva padrão de Pirogalol.....	42
Figura 10	Curva padrão de Quercetina.....	42
Figura 11	Cromatografia em camada delgada dos extratos da <i>P. reticulata</i> . Sistema solvente: A: acetona (10%); clorofórmio (75%); ácido fórmico (8%); B: acetato de etila (100%); ácido fórmico (11%); ácido acético glacial (11%); água (27%). Revelador Cloreto Férrico (FeCl ₃). Extratos: EHEX (a), EDM (b), EAET (c), EMET (d); padrões: (e), ácido tânico; (f), ácido clorogênico; (g), ácido caféico; (h), apigenina; (i), naringenina; (j), quercetina; (l), rutina.....	43
Figura 12	Cromatografia em camada delgada dos extratos da <i>P. reticulata</i> . Sistema solvente: acetona (10%); clorofórmio (75%); ácido fórmico (8%). Revelador NEP/PEG. Extratos: EHEX (b), EDM (d), EAET (f), EMET (h); padrões: (a), ácido caféico; (c), ácido tânico; (e), ácido clorogênico e (g), rutina.....	44

Figura13	Cromatografia em camada delgada dos extratos da <i>P. reticulata</i> . Sistema solvente: acetato de etila (100%); ácido fórmico (11%); ácido acético glacial (11%); água (27%) Revelador NP/PEG. Extratos: EHPr (a), EAET (b), EDM (c), EHEX (d), EMET (e); padrões: (f), ácido caféico; (g), ácido clorogênico; (h) ácido tânico; (i) apigenina, (j) atropina, (k), β -sitosterol; (l), cumarina, (m) naringenina, (n) quercetina, (o) rutina.....	44
Figura14	Curva padrão do ácido tânico.....	45
Figura15	Efeito farmacológico dos extratos da <i>P. reticulata</i> em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob estímulo indireto. A, B, C e D representam os extratos EHEX, EDM, EAET e EMET, respectivamente, nas concentrações de 0,1mg/mL; 0,2mg/mL e 0,4mg/mL. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média dos experimentos (* $p < 0,05$ no ponto indicado e demais subsequentes, em relação ao controle Tyrode).....	47
Figura16	Registros miográficos de preparações nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto, sendo (A) tyrode (controle) e (B) tratada com veneno bruto da Bjssu (40 μ g/mL). Flecha: momento da adição do veneno.....	48
Figura17	Ação farmacológica dos extratos da <i>P. reticulata</i> em mistura com o veneno bruto da Bjssu (40 μ g/mL), em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob estímulo indireto. A, B e C representam as concentrações dos extratos de 0,1mg/mL; 0,2mg/mL; e 0,4mg/mL, respectivamente.....	50
Figura18	Corte transversal de preparação incubada com: A, solução de Tyrode (controle), B (EDM 0,4mg/mL), C (veneno bruto de Bjssu 40 μ g/mL) e D (veneno de Bjssu 40 μ g/mL + EDM 0,4mg/mL), observada no tempo de 120 min.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores do índice de miotoxicidade da contagem das células dos músculos tratados com Tyrode (controle), veneno bruto de Bjsu, extrato EDM e mistura (veneno + extrato).....	51
Tabela 2	Atividade mutagênica expressa pela média $\pm$ desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens bacterianas TA98, TA97a, TA100 e TA102 expostas ao extrato hidroalcoólico da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth, em várias concentrações sem (-S9) ativação metanólica.....	54
Tabela 3	Atividade mutagênica expressa pela média $\pm$ desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens bacterianas TA98, TA97a, TA100 e TA102 expostas ao extrato hidroalcoólico da <i>Plathymenia reticulata</i> Benth, em várias concentrações com (+S9) ativação metanólica.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

P. reticulata – *Plathymenia reticulata* Benth

H. courbaril – *Hymenaea courbaril*

G. ulmifolia – *Guazuma ulmifolia*

Bjssu – *Bothrops jararacussu*

OMS - Organização Mundial da Saúde

ATCC - (American Type Culture Collection)

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

EHEX – Extrato hexano

EHP_r – Extrato hidroalcoólico da *Plathymenia reticulata*

EDM – Extrato diclorometano

EAET – Extrato acetato de etila

EMET – Extrato metanol

NaCl – Cloreto de sódio

KCl – Cloreto de potássio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

NP- ácido 2-aminoetiléster difenilbórico

PEG- polietilenoglicol

BSA – Soro albumina bovina

SDS – Dodecilsulfato de sódio

DMSO – Dimetil sulfóxido

N- Núcleos

E – Lesão do tipo Edema

LD – Lesão do tipo Delta

H – Hipercontração

RM- Razão de mutagenicidade

IM- Índice de mutagenicidade

NADP - Nicotinamida dinucleotídeo fosfato

FeCl₃ – Cloreto férrico

HCl – Ácido clorídrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Importância do estudo com plantas medicinais.....	18
2.2	<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.....	19
2.3	Cerrado Brasileiro.....	21
2.4	Serpentes peçonhentas.....	22
2.4.1	Gênero <i>Bothrops</i>	22
2.4.2	<i>Bothrops jararacussu</i>	23
3	OBJETIVOS.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	Material Vegetal.....	26
4.2	Estudo Fitoquímico da <i>Plathymenia reticulata</i>.....	26
4.2.1	Determinação de cinzas.....	26
4.2.2	Teste de umidade.....	27
4.2.3	Caracterização de taninos.....	27
4.2.4	Doseamento de Fenólicos Totais.....	28
4.2.5	Doseamento de Flavonóides Totais.....	30
4.2.6	Obtenção do extrato hidroalcoólico da <i>P. reticulata</i> (extração a frio).....	30
4.2.7	Obtenção dos extratos, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (extração a quente – Soxhlet).....	31
4.2.8	Cromatografia em Camada Delgada – CCD.....	31
4.2.9	Extração e doseamento de taninos.....	32
4.3	Estudo Farmacológico da <i>Plathymenia reticulata</i>.....	33
4.3.1	Animais.....	33
4.3.2	Veneno.....	33
4.3.3	Isolamento da preparação nervo-frênico diafragma de camundongos.....	33
4.4	Estudo Morfológico dos Músculos Tratados.....	34
4.4.1	Microscopia de Luz.....	34
4.5	Ensaio Toxicológico da <i>Plathymenia reticulata</i>.....	38
4.5.1	Teste de Mutagenicidade (Teste de Ames).....	38
4.6	Análise Estatística.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Estudo Fitoquímico.....	41
5.2	Estudo Farmacológico.....	45
5.3	Estudo Morfológico dos Músculos Tratados.....	51
5.4	Estudo Toxicológico.....	54
5.4.1	Teste de Mutagenicidade (Teste de Ames).....	54
6	DISCUSSÃO.....	56

7	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	ANEXO A.....	73
	ANEXO B.....	74

1. INTRODUÇÃO

A *Plathymania reticulata* Benth, conhecida popularmente como vinhático, pertence à família Leguminosae (Fabaceae); é uma planta típica do Cerrado, um dos biomas mais ameaçados do planeta devido à velocidade de conversão de áreas nativas em áreas antropizadas. (KLINK; MACHADO, 2005)

Com o desmatamento, aumenta o número de acidentes ofídicos pelo deslocamento desses animais de seu habitat natural e pela invasão do homem. Esse número alcançou seu maior índice em 2005 e, desde então, vem apresentando decréscimo com registro de 26.156 acidentes em 2008, correspondendo à incidência de 3,8 casos por 100.000 habitantes no Brasil, a menor desde 2005. O acidente botrópico (gênero *Bothrops*) corresponde a 73,5% dos casos de ofidismo notificados no país. (BRASIL, 2008)

Plantas com potencial antiofídico tem despertado crescente interesse no campo da investigação científica visando ao tratamento adjuvante à soroterapia e à fisiopatologia do envenenamento, entre outras razões, um requisito que a *P. reticulata* demonstrou atingir, conforme trabalhos prévios realizados por Melo et al. (2009). Em favor da planta, encontrou-se alta concentração de proteína solúvel com alto nível de atividade enzimática em suas sementes (CARAMORI; LIMA; FERNANDES, 2004). Fernandes, Santos e Pimenta (2005) verificaram a atividade antimicrobiana dos extratos da *Hymenaea courbaril*, *Guazuma ulmifolia* e *Plathymania reticulata* para a maioria das bactérias gram-positivas analisadas. Neto (2006) mencionou a utilização da casca do caule e ramos da *P. reticulata* em banhos para o tratamento de varizes. Ainda segundo estudos realizados por Aquino, Walter e Ribeiro (2007), a *P. reticulata* apresentou potencial para sete categorias: medicinal, madeireira, tintorial, ornamental, artesanal, tanífera e apícola.

Tais atribuições medicinais à espécie, desperta o interesse em investigar o grau de segurança de seu uso, através de teste de triagem (Teste de Ames), utilizado em larga escala para avaliação de mutagenicidade em amostras ambientais. Trata-se de um ensaio de mutação reversa que emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a sua capacidade de síntese (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). É interessante analisar o potencial de mutagenicidade da

P. reticulata, visto que, muitas vezes, a população utiliza as plantas aliada à crença de que, por serem naturais, não causam reações adversas. Porém, nem sempre as plantas com potencial medicinal tem apenas poder benéfico sobre o organismo humano.

Visando contribuir com a fisiopatologia do acidente ofídico e com a busca de alternativas terapêuticas adicionais à soroterapia, os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar o efeito farmacológico de extratos de diferentes polaridades obtidos de cascas da *P. reticulata* contra o bloqueio neuromuscular irreversível induzido pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (Bjssu), em preparações isoladas nervo frênico-diafragma de camundongo; 2) realizar análise histológica dos músculos diafragmas utilizados no estudo farmacológico; 3) avaliar o índice de mutagenicidade do extrato hidroalcoólico da *P. reticulata*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância do estudo com plantas medicinais

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas por povos de várias civilizações há mais de cinco mil anos e investigações de espécies vegetais de uso medicinal empírico, resultaram em alguns avanços terapêuticos. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, as plantas medicinais continuam sendo utilizadas e, estima-se que 25% a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos derivam de produtos naturais. (CALIXTO, 2005)

No Brasil, o surgimento de uma medicina popular com uso das plantas deveu-se aos índios, com contribuições dos negros e europeus. Esse processo de miscigenação gerou uma diversificada bagagem de usos para as plantas e seus aspectos medicinais, que sobreviveram de modo marginal até a atualidade. (ARAÚJO, 1979)

Segundo Garcia (1995), a Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população do planeta utilizam, de algum modo, plantas medicinais como medicamentos, englobando a utilização de cerca de 25.000 espécies.

A pesquisa e produção de novos fármacos a partir de plantas envolvem diversos campos do conhecimento e vários métodos de análise. Geralmente, têm início com um botânico, etnobotânico ou ecólogo que coleta e identifica a planta. Essa coleta geralmente é realizada para plantas que podem ter algum princípio ativo, pois estão relacionadas taxonomicamente às espécies com compostos ativos já conhecidos ou que já são utilizadas na medicina popular de uma determinada região (BALUMAS; KINGHORN, 2005). Após as etapas de coleta, identificação, secagem e armazenagem adequada, o material vegetal está pronto para iniciar os estudos fitoquímicos. A moagem só deverá ser efetuada na ocasião da preparação dos extratos. A preparação dos extratos é feita geralmente por percolação (método de extração a frio), Soxhlet (método de extração a quente) ou ácido-base.

A percolação é o processo a frio de extração por solventes e apresenta menor risco de reações químicas e formação de artefatos, estes decorrentes da ação combinada entre solventes e temperaturas elevadas (utilizadas pelo sistema Soxhlet). (MACIEL et al., 2002)

No método Soxhlet de extração a quente, o material vegetal, em cada ciclo da operação, entra em contato com o solvente renovado. Assim, o processamento possibilita uma

extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida de solvente em comparação com as quantidades necessárias nos outros processos extrativos para se obter os mesmos resultados qualitativos e quantitativos. (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000)

Para integrar estudos fitoquímicos e farmacológicos, a avaliação farmacológica de extratos brutos, frações e substâncias isoladas devem seguir rigorosamente às indicações terapêuticas empíricas divulgadas por estudos etnobotânicos. A seleção correta de testes biológicos específicos permitirá uma avaliação do uso terapêutico da espécie vegetal, fornecendo, também, informações sobre a toxicidade da planta. (MACIEL et al., 2002)

Acidentes ofídicos podem causar sequelas, muitas vezes incapacitantes e, por isso, a investigação de substâncias que atenuem os efeitos tóxicos locais de venenos ofídicos é extremamente desejável. As plantas, por sua vez, representam uma interessante alternativa, pois estão presentes de forma abundante na natureza e são de fácil acesso. Elas têm sido frequentemente usadas pelos humanos contra numerosas doenças causadas por diversos agentes patológicos (MORS et al., 2000; MAISTRO; CARVALHO; MANTOVANI, 2004). Estudos farmacológicos têm demonstrado que extratos e frações de algumas dessas plantas usadas na medicina tradicional possuem propriedades antiinflamatórias, antiviral e antiofídica. (MORS et al., 2000; JANUÁRIO et al., 2004)

2.2 *Plathymania reticulata* Benth

A *Plathymania reticulata* Benth (Figura 1) pertence à família Leguminosae (Fabaceae) (FERNANDES, 2002), popularmente conhecida como “Vinhático”, um nome que remete para o “vinho tinto”, cor do tronco da árvore (SILVA JÚNIOR, 2005). Encontra-se distribuída principalmente no Brasil, em pelo menos 15 estados (LORENZI, 2002), mas também em outros países, como Bolívia, Paraguai e Suriname (WARWICK; LEWIS, 2003). Foi primeiramente descrita por Benth em 1842, com duas espécies (*Plathymania reticulata* e *Plathymania foliolosa*), considerando a primeira ocorrer em savanas do bioma Cerrado e a segunda em fisionomias florestais e biomas florestais.



Figura 1. *Plathymenia reticulata* Benth

Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/56/Plathymenia_reticulata.jpg
&imgrefurl=<http://commons.wikimedia.org/wiki/>

A *P. reticulata* foi classificada pelo Instituto Brasileiro de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 1994) como uma das espécies vegetais mais importantes do Cerrado (ALMEIDA; PROENÇA; SANO, 1998) devido a sua madeira de alta qualidade, potencial de utilização para recuperação de áreas degradadas (HERINGER; FERREIRA, 1972; LORENZI et al., 1992), e por seu uso na medicina popular (SILVA JÚNIOR, 2005). Pode medir de 6-12 metros de altura e 30-50 cm de diâmetro do caule. (LORENZI et al., 2002)

A espécie possui como um de seus componentes químicos os taninos e flavonóides (FERNANDES, 2002). Os taninos são substâncias fenólicas e hidrossolúveis. Os flavonóides são substâncias amplamente distribuídas na natureza e são importantes por possuírem efeitos biológicos, incluindo atividade antimicrobiana e cardiovascular. (MEDEIROS, 2003)

2.3 Cerrado Brasileiro

O Brasil é um país rico em diversidade cujo território possui cinco principais biomas designados como Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga. Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pobremente explorado ou regulamentado, ao contrário do que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá. (RATTES, 2001)

O Cerrado ocupa uma superfície estimada em 2.000.000 km² (23% do território nacional), abrangendo os estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia, São Paulo e Tocantins (KLINK; MACHADO, 2005); possui cerca de 6.420 espécies vasculares. (MENDONÇA et al., 1998)

Ainda que seja o 2º maior ecossistema do país em área, a região do Cerrado ainda não recebe o merecido destaque por parte dos programas governamentais de preservação ambiental (MYERS et al., 2000). Somente na última década, precisamente a partir de 1998, com o então projeto *Ações Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade do Cerrado e Pantanal* (Brasil, 1999), passa-se a reconhecer a importância biológica e social deste bioma, fortemente ameaçado. (KLINK; MACHADO, 2005)

Estudos realizados por Ferreira, et al. (2007) demonstram que as áreas de mudanças referentes ao desmatamento do Cerrado variam de 58.889 km² (2001-2002) a 24.721 Km² (2004-2005), verificando uma acentuada redução em área, de aproximadamente 50%.

Neste sentido há necessidade de eliminar a distância que separa a técnica e a pesquisa científica das tradições, costumes e crenças populares, dando a esses conhecimentos a comprovação científica e contribuindo para divulgar à população em geral conhecimentos úteis, além de agregar valores medicinais às espécies presentes na região do Cerrado. (BORBA; MACEDO, 2006)

2.4 Serpentes peçonhentas

Há atualmente cerca de 2900 espécies de serpentes, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias (FRANCO, 2003). Destas, 250 são conhecidas no Brasil, das quais 70 são consideradas peçonhentas e pertencentes a dois grupos, crotalíneos e elapíneos, e quatro gêneros, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* sendo responsáveis por cerca de 20.000 vítimas por ano. (BOCHNER, 1999)

Os acidentes ofídicos são um sério problema de saúde pública, especialmente em regiões tropicais do mundo. Em geral, estão relacionados a fatores climáticos e aumento da atividade humana nos trabalhos no campo. A faixa etária acometida varia de 15 a 49 anos, sendo o sexo masculino o mais prevalente. (BRASIL, 2001)

A obrigatoriedade da notificação, a partir de 1988/89, permitiu um maior conhecimento sobre os envenenamentos ofídicos no Brasil (BRASIL, 2001). Dentre os acidentes por serpentes, o botrópico destaca-se pela sua elevada incidência. (RIBEIRO; JORGE; IVERSSON, 1995; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003)

2.4.1 Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* possui algumas das espécies mais importantes para a Saúde Pública, pois representa cerca de 90% dos 20.000 acidentes ofídicos anuais registrados no Brasil (BRASIL, 2001). Pertencente ao grupo dos crotalíneos é composto por mais de 30 espécies de serpentes que apresentam cores e desenhos diferentes pelo corpo, variando do verde ao negro. Pertencem a este grupo a jararaca, urutu, caiçara, cotiara, jararaca pintada e jararacuçu.

O envenenamento por *Bothrops* causa inflamação (edema e eritema), equimose, bolhas e necrose (ação proteolítica) na região da picada e, sistemicamente, ativa a cascata da coagulação podendo induzir incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio (ação coagulante) e ação hemorrágica atuando no endotélio vascular na região da picada e em alguns casos à distância. Nos casos mais graves ocorrem choques e insuficiência renal podendo determinar óbito. (JORGE et al., 1995; JORGE; RIBEIRO, 1990; RIBEIRO; JORGE, 1997)

2.4.2 *Bothrops jararacussu*

A *Bothrops jararacussu* (Figura 2) apresenta cabeça triangular, fosseta lateral, cauda lisa e presa inoculadora de veneno. Possui hábitos noturnos e apresenta tamanho médio de 1,40 metros. Encontra-se distribuída em todo território nacional, principalmente em Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Espírito Santo, sul da Bahia e São Paulo. (BOCHNER, 1999; BORGES, 1999)



Figura 2. *Bothrops jararacussu*.

Fonte: <http://www.panoramio.com/photo/917934>

O veneno da serpente *Bothrops jararacuçu*, além das ações já citadas anteriormente, características do gênero, provoca também ação neurotóxica representada pelo bloqueio irreversível da contração muscular, e miotoxicidade em células musculares. (JIA et al., 1966; TU, 1977; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; LANDUCCI et al., 1998)

A soroterapia, cuja produção nacional cabe a apenas três entidades governamentais (Instituto Butantan, São Paulo; Fundação Ezequiel Dias, Minas Gerais e Instituto Vital Brazil, Rio de Janeiro), é o único método de eficácia comprovada no tratamento de acidentes ofídicos, desde que administrada em tempo, dose e via adequados. (BRASIL, 2001)

Porém, apesar da eficiência na neutralização dos efeitos sistêmicos, este tratamento contribui pouco para a melhoria do quadro local, resultando no aparecimento de sequelas graves e perda tecidual. A efetividade da soroterapia em prevenir o dano tecidual local é limitada, pelo menos em parte, pela rápida ação das toxinas comparada com a distribuição lenta de anticorpos. (LOMONTE; LEON; HANSON, 1996)

Algumas alternativas, como usos de extratos de plantas, têm sido propostas como coadjuvantes dos antivenenos, devido a várias plantas já apresentarem atividade antiofídica (MORS et al., 2000). No entanto, em alguns casos, a comprovação científica de sua atividade ainda é necessária.

3. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste estudo foram: 1) avaliar o efeito farmacológico dos extratos de diferentes polaridades obtidos de cascas da *P. reticulata* contra o bloqueio neuromuscular irreversível induzido pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (Bjssu), em preparações isoladas nervo frênico-diafragma de camundongo; 2) realizar análise histológica dos músculos diafragmas, decorrentes do estudo farmacológico; 3) avaliar o índice de mutagenicidade do extrato hidroalcoólico da *P. reticulata*, através do Teste de Ames, utilizando cepas mutantes de *Salmonella typhimurium*.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Realizar a caracterização fitoquímica da planta.
- ✓ Obter extratos provenientes de solventes de diferentes polaridades, através do método Soxhlet de extração.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

As cascas do caule da *Plathymenia reticulata* (Figura 3) foram cedidas pelos Profs. e Drs. Cháriston André Dal Belo e Márcio Galdino dos Santos da Universidade Federal de Tocantins. Foram coletadas em Miracema (TO) no Município de Porto Nacional e a exsicata foi alocada no Herbário do Núcleo de Estudos Ambientais – NEAMB da Universidade Federal de Tocantins (UFT) (NRHTO 3327 Coord. 48° 23' 39" S - 9° 41' 34" W).

Para adequação do teor de umidade e garantia de armazenamento, as cascas foram desidratadas em estufa de circulação de ar a 40°C (Fanen® mod. MAO35), por sete dias. Após secagem, o material vegetal foi pulverizado em moinho de facas e martelos (Marconi® mod. 035) e posteriormente armazenado em sacos plásticos (Figura 4).



Figura 3. Cascas da *P. reticulata* Benth



Figura 4. Pó das cascas da *P. reticulata* Benth

4.2 Estudo Fitoquímico da *Plathymenia reticulata*

4.2.1 Determinação de cinzas

O teor de cinzas foi determinado através da técnica gravimétrica preconizados pela Farmacopéia Portuguesa VII, 2002.

Primeiramente foi realizada a calcinação de seis cadinhos de porcelana, colocando-os em uma mufla (Quimis®) por 3 horas a 650° C, para posterior pesagem em balança analítica (Marte®).

Em seguida, pesou-se 1g do pó da droga vegetal em cada cadinho calcinado. Os cadinhos foram incinerados no bico de Bunsen, em uma capela de exaustão, até queimar totalmente a droga.

Os cadinhos incinerados foram colocados na mufla durante 4 horas a 650° C para posterior pesagem. Através dos valores obtidos com as pesagens, calculou-se a porcentagem do teor de cinzas presente na droga.

4.2.2 *Teste de umidade*

O teor de umidade foi determinado conforme descrito na Farmacopéia Brasileira, 1988. Primeiramente foi realizada a calibração de seis cápsulas de porcelana colocando-as em uma estufa (Quimis®) a 105° C durante 4 horas, para posterior pesagem. Em seguida, pesou-se 1g do pó da droga, em cada cápsula calibrada. As cápsulas contendo a droga foram colocadas novamente na estufa a 105° C durante 4 horas, para posterior pesagem. Através dos valores obtidos com as pesagens, calculou-se a porcentagem do teor de umidade presente na droga.

4.2.3 *Caracterização de taninos*

Primeiramente foi realizado o procedimento de extração, pesando-se 2g do pó da droga. Em seguida, adicionaram-se 40 mL de água destilada e levou a fervura por 2 minutos. Feito isso, filtrou-se o sobrenadante através de papel filtro, mantendo o pó da droga no fundo, para realizar mais uma extração de 20 mL. Acrescentou-se o segundo filtrado ao primeiro. Em seguida, foram realizadas as reações gerais de caracterização de taninos.

Adicionaram-se 5 mL do extrato preparado anteriormente em 4 tubos de ensaio e procederam-se às reações abaixo:

- (Reação A) Acrescentaram-se, pelas paredes, 3 gotas de solução de cloreto férrico (Nuclear®) a 2% em um dos tubos de ensaio. Em seguida, observou-se a cor desenvolvida (azul violáceo para taninos hidrolisáveis ou verde para taninos condensados).
- (Reação B) Acrescentaram-se 3 gotas de solução aquosa de acetato de chumbo (Sigma®) a 10% em um outro tubo de ensaio.
- (Reação C) Acrescentaram-se 3 gotas de acetato de cobre 5% em um terceiro tubo de ensaio.

- (Reação D) Acrescentaram-se 3 gotas de gelatina a 2% em um último tubo de ensaio.

Foram realizadas, na sequência, as reações específicas de caracterização de taninos.

- Taninos hidrolisáveis :

- Reação com acetato de chumbo e ácido acético glacial.

Em 5 mL do extrato preparado anteriormente adicionaram-se 5 mL de ácido acético glacial (Nuclear®) diluído a 10% e 3 mL de solução de acetato de chumbo a 10%.

- Taninos condensados:

- Reação com reativo de Wasicky

Filtrou-se a reação anterior para eliminar o precipitado. Ao filtrado adicionaram-se 5 mL de solução de p-dimetilaminobenzaldeído (JK Baker®).

- Teste para catequinas

Em 5 mL do extrato adicionou-se um pedaço de madeira (palito de dente) e levou-se a fervura por 2 minutos. Após secar o palito dente com um papel toalha, adicionaram-se algumas gotas de ácido clorídrico concentrado.

4.2.4 Doseamento de Fenólicos Totais

A quantificação de polifenólicos totais foi determinada através de espectrofotometria pela complexação com reagente Folin - Denis (reativo fosfomolibdico), (Cromato®), (ver preparo abaixo). (REICHER, SIERAKOWSKI, CORRÊA, 1981)

Uma alíquota de 5 mL do extrato hidroalcoólico a 20% da *P. reticulata* foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL, sendo este o balão 1a, completando o volume com água destilada. Em seguida o balão foi colocado no ultra-som. Esta etapa foi realizada em duplicata, obtendo-se um segundo balão volumétrico, 1b.

Partindo do extrato diluído anteriormente (balão 1a e 1b), transferiu-se uma alíquota de 1 mL para um balão volumétrico de 10 mL completando o volume com água destilada, sendo este o balão 2a. Esta etapa também foi realizada em duplicata, obtendo-se então o balão 2b.

Em seguida, adicionou-se em um tubo cônico graduado de 10 mL, 1 mL do extrato diluído anteriormente, 1 mL de reativo fosfomolibdico e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio a 15% (ver preparo abaixo). Esta etapa foi realizada em triplicata.

Após 30 minutos, realizou-se a leitura em espectrofotômetro Fento® em um comprimento de onda de 720 nm, utilizando a solução de carbonato de sódio como branco. Calculou-se a concentração de polifenólicos totais através de curva-padrão de pirogalol (Synth®), previamente determinada segundo a mesma metodologia.

- Reativo fosfomolibdico

Primeiramente pesou-se 2 g de ácido fosfomolibdico (Merck®), 10 g de tungstato de sódio (Nuclear®) e mediu-se em uma proveta 100 mL de água destilada e 5 mL de ácido fosfórico 85% (Synth®). Em seguida, foram misturados em um béquer até a solução apresentar-se devidamente solubilizada.

Após preparar a solução, montou-se um refluxo, utilizando uma manta de aquecimento (FISATOM®), um condensador, um balão de fundo redondo de 250 mL com bolinhas de vidro no fundo e pedaços de borracha para entrada e saída de água. A solução permaneceu em refluxo por mais ou menos 9 horas, até apresentar uma coloração esverdeada. Em seguida adicionou-se 15 g de sulfato de lítio (Dinâmica®) e completou-se o volume da solução para 100 mL com água destilada. Após o preparo, manteve-se a solução em refrigeração em um frasco âmbar.

- Solução de Carbonato de Sódio (Na₂CO₃) a 15%

Pesou-se 150 g de carbonato de sódio (CAAL®), dissolveu-se em água destilada e completou o volume em um balão volumétrico de 1000 mL. Após o preparo a solução foi filtrada com papel filtro.

4.2.5 Doseamento de Flavonóides Totais

Uma alíquota de 10 mL do extrato hidroalcoólico a 20% da *P. reticulata* foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL completando o volume com metanol 80%, em seguida o balão foi colocado no ultra-som, sendo este o balão 1a. Esta etapa foi realizada em duplicata, obtendo-se um segundo balão, 1b.

Transferiu-se uma alíquota de 5 mL do extrato diluído anteriormente para outro balão de 50 mL, completando o volume com metanol 80%, em seguida o balão foi colocado no ultra-som, sendo este o balão 2a. Esta etapa também foi realizada em duplicata

Feito isso, transferiu-se uma alíquota de 2 mL do balão 2a para um tubo cônico graduado de 10 mL, adicionou-se 1mL de solução de cloreto de alumínio anidro (ver preparo abaixo) e completou-se o volume com metanol PA. Esta etapa foi realizada em triplicata.

Após 15 minutos, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Fento®) em um comprimento de onda de 420 nm, utilizando como branco uma solução com 2 mL de cloreto de alumínio anidro e 8 mL de metanol PA, conforme descrito na Farmacopéia Portuguesa, 2002.

- Solução de Cloreto de Alumínio Anidro

Foram pesados 5 g de cloreto de alumínio anidro (Merck®), em seguida com auxílio béquer de 250 mL foram adicionados 80 mL de metanol PA e transferiu-se aos poucos o cloreto de alumínio anidro, solubilizando com a ajuda de um bastão de vidro.

4.2.6 Obtenção do extrato hidroalcoólico da *P. reticulata* (extração a frio)

O extrato hidroalcoólico foi preparado através do processo de percolação, utilizando-se 50 g do pó da droga, empregando-se como líquido extrator álcool etílico (Synth®) a 70%. Considerou-se o pó da casca da *P. reticulata* esgotado após o uso de 500 mL de líquido extrator. Este extrato denominado EHPr foi utilizado nos ensaios de doseamento de flavonóides e fenólicos totais. Para os ensaio de mutagenicidade (teste de Ames) utilizou-se o resíduo seco do EHPr. O EHPr não foi utilizado nos ensaios farmacológicos, visto já possuir estudos na literatura. (MELO et al., 2009)

4.2.7 Obtenção dos extratos, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (extração a quente – Soxhlet)

O pó da droga (50 g) foi extraído com solventes (350 mL) de diferentes polaridades (hexano, Nuclear®; diclorometano, Nuclear®; acetato de etila, Synth®; metanol, Synth®) em um aparelho de Soxhlet (Figura 5), obtendo-se os respectivos extratos, que foram evaporados

em banho-maria. Esses extratos foram utilizados nos ensaios farmacológicos e na cromatografia em camada delgada.

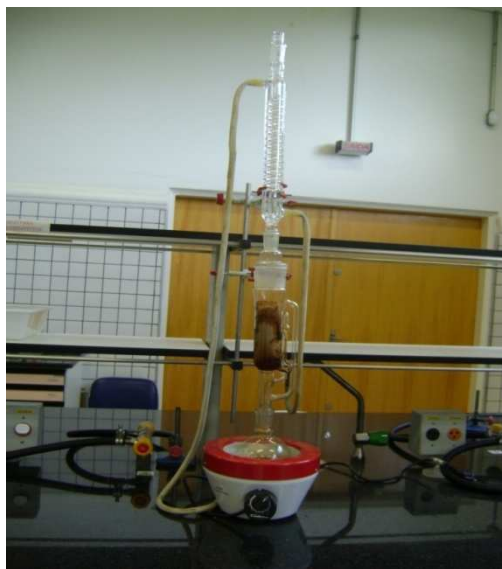


Figura 5. Soxhlet contendo cartucho de papel filtro com pó da casca da *P. reticulata*

4.2.8 Cromatografia em Camada Delgada – CCD

Alíquotas do extrato hexano (EHEx), diclorometano (EDM), acetato de etila (EAET) e metanol (EMET) de *P. reticulata* foram aplicados em uma placa de 0,3 mm de sílica gel. Foram testados vários sistemas de solventes para a separação dos compostos presentes nos extratos, sendo os que produziram melhor separação as misturas acetona (Synth®) (10%): clorofórmio (Fmaia®) (75%): ácido fórmico (Synth®) (8%) e acetato de etila (Synth®) (100%); ácido fórmico (Synth®) (11%); ácido acético glacial (Merck®) (11%); água (27%).

Como reveladores foram utilizados NP/PEG, sendo primeiramente pulverizada a solução metanólica 1% de NP (1g de ácido 2-admizainoetiléster difenilbórico (NP) (Sigma®) qsp 100 mL de metanol) seguida da solução etanólica 5% de PEG (5g de polietileno glicol (PEG) (qsp 100 mL de etanol) e visualizada na luz UV e Cloreto Férrico (10% em solução aquosa), nos dois sistemas solventes.

A presença de grupos fitoquímicos foi investigada em comparação com soluções-padrão de ácido caféico (Synth®), ácido clorogênico (Synth®), rutina (Synth®), ácido tânico (Synth®), apigenina (Synth®), atropina (Synth®), β -sitosterol (Synth®), cumarina (Synth®), naringenina (Synth®), quercetina (Synth®), solubilizados em metanol (1mg/mL).

4.2.9 Extração e doseamento de taninos

Nesta etapa utilizou-se somente o EMET, pois a polaridade dos demais extratos não permitiu a completa solubilização dos mesmos com o solvente utilizado na técnica, não sendo possível realizar a extração e doseamento dos taninos presentes.

A extração foi realizada solubilizando 100 mg do EMET com 10 mL de metanol 50% e deixando em repouso por 1 hora. Uma alíquota de 1 mL foi adicionada em 2 mL de solução de albumina do soro bovino (BSA, ver preparo abaixo), para precipitação das proteínas. Após 10 min. a solução foi centrifugada e ao precipitado adicionou-se 4 mL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS, ver preparo abaixo) que foi agitado vigorosamente e adicionado 1 mL do reagente de cloreto férrico (ver preparo abaixo). Após 15 min. foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro (Shimadzu®) em 510 nm, conforme o método colorimétrico de Hagerman e Butler (1989). A análise foi realizada em triplicata.

- Solução de BSA (soro albumina bovina)

5 g de cloreto de sódio (Nuclear®) foi solubilizado com 500 mg de Albumina (Sigma®) em 200 mL de água destilada. Adicionaram-se à solução 5,72 mL de ácido acético glacial (Fmaia®) e o pH foi ajustado para 5.0 com solução de NaOH 0,5 N. O volume foi ajustado para 500 mL com água destilada.

- Solução SDS (dodecilsulfato de sódio)

2,5 g de dodecilsulfato de sódio foi solubilizado com 12,5 mL trietanolamina, em seguida adicionou-se 50 mL de isopropanol (Synth®). O volume foi ajustado para 250 mL com água destilada.

- Reagente de Cloreto Férrico

0,402 g de FeCl_3 foi solubilizado com 0,153 mL de HCl 0,01 N, em seguida adicionou-se água destilada até completar o volume para 250 mL.

4.3 Estudo Farmacológico da *Plathymenia reticulata*

4.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25 a 30 g, adquiridos do produtor “Animais de Laboratório” (ANILAB, Paulínia, Brasil) e mantidos no Biotério da UNISO em gaiolas, aclimatados a 25° C e recebendo ração e água *ad libitum*. O projeto foi realizado segundo as normas preconizadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (CEP/UNIVAP), protocolo nº A22/CEP/2008 (Anexo A).

4.3.2 Veneno

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (Bjssu) foi doado e certificado pelo Prof. Dr. José Carlos Cogo, da UNIVAP, São José dos Campos, SP.

4.3.3 Isolamento da preparação nervo frênico-diafragma de camundongos

Os camundongos foram anestesiados com halotano e, em seguida, foram sacrificados pela secção e sangria dos vasos cervicais. A preparação (músculo diafragma, juntamente com seu nervo frênico) foi cuidadosamente retirada (BÜLBRING, 1946), colocada em cuba contendo 5 mL de solução de Tyrode (solução nutritiva: pH 7,0: composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,1) e, em seguida, preso através dos músculos da costela, por ganchos existentes na base da cuba. Uma tensão de 5g/cm foi aplicada por meio de um fio preso a porção tendinosa e ao transdutor isométrico. A temperatura foi mantida a 37° C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂).

Nestas condições, o nervo frênico, em resposta a estímulos indiretos supramaximais (estimulador fisiológico duplo ESF15D), de 0,2 ms de duração e 0,06 hz de frequência, ao liberar o neurotransmissor terá o sinal químico transduzido (transdutor de força isométrica cat. 7003, Ugo Basile), amplificado (amplificador básico para Gemini cat. 7080) e a força da resposta contrátil resultante, será registrada em um fisiógrafo (Gemini duplo canal cat. 7070, Ugo Basile).

Após 15 a 20 minutos de estabilização da preparação, foram realizados os protocolos farmacológicos. Como controle utilizou-se a solução de Tyrode. Os ensaios com os extratos

da *P. reticulata* (EHEX, EDM, EAET e EMET) foram realizados em três concentrações diferentes (0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL). Para os ensaios de neutralização foram utilizados veneno bruto da Bjssu (40 µg/mL) e misturas pré-incubadas (15 minutos) de Bjssu (40 µg/mL) + extratos ((EHEX, EDM, EAET e EMET) nas mesmas concentrações citadas anteriormente.

Para a realização dos ensaios com os extratos isolados e em mistura com o veneno de Bjssu, os mesmos foram solubilizados com 15 µL solvente PEG 400 antes de se completar o volume desejado com solução de Tyrode. Tal solvente, quando utilizado nessa quantidade, não apresenta nenhuma interferência na preparação durante o protocolo experimental nem mesmo altera a morfologia normal da fibra muscular. (OSHIMA et al., 2010)

As preparações resultantes de protocolos experimentais utilizando o controle (solução de Tyrode) e expostas ao extrato mais ativo, bem como sua mistura com o veneno Bjssu e o veneno sozinho, foram reservadas para análise histológica.

4.4 Estudo Morfológico dos Músculos Diafragma

4.4.1 Microscopia de Luz

Para a análise das microestruturas anatômicas dos tecidos de animais sob microscopia de luz foi necessária a confecção de lâminas histológicas. Nesta etapa utilizaram-se músculos diafragma expostos ao extrato mais ativo e em mistura com o veneno de Bjssu e o veneno sozinho, além dos músculos utilizados como controle (solução Tyrode), conforme descrito a seguir.

Ao final dos protocolos experimentais, realizados no estudo farmacológico, os músculos foram retirados da cuba e fixados em solução Bouin durante 24-48 horas. Posteriormente foram lavados com água e aproximadamente 2 mL de hidróxido de sódio (NaOH 6 M) para remoção do ácido pícrico evitando interferência na histologia. Armazenou-se em álcool 70%, preparado com água destilada e álcool absoluto PA 99,5% (ECIBRA®), permanecendo até a etapa de desidratação. O processo de desidratação foi seguido com lavagens de hora em hora com álcool etílico em concentrações crescentes, de 85%, passando a 96% até o absoluto, onde realizou seis trocas, sendo a quinta, *overnight*.

A etapa de diafanização iniciou-se logo após o término da sexta troca do álcool absoluto, passando por duas trocas de Xilol (Synth®) de hora em hora. Ao término, os músculos foram cortados em três partes aproximadamente iguais.

Para a etapa de inclusão, aproximadamente 180 g de Paraplast® Plus foram colocados em um Becker e levado a estufa, com temperatura de $54^{\circ}\text{C} \pm$. No dia seguinte, iniciou-se a etapa, mergulhando os músculos que foram cortados em três pedaços em frascos separados, realizando três trocas de Paraplast® Plus de 3 em 3 horas, sendo a última *overnight*.

O emblocamento dos músculos foi realizado em uma bandeja de plástico com poços redondos de aproximadamente 3,5 cm de diâmetro, contendo Paraplast® Plus suficiente para encobrir todo músculo colocado na posição horizontal e permaneceu secando sobre uma superfície plana por dois dias.

Após o bloco estar bem seco, foi solto da bandeja e com o auxílio de uma espátula aquecida em um bico de Bunsen, o bloco foi derretido até a forma de um quadrado, deixando o músculo bem centralizado dentro do bloco de Paraplast® Plus que, posteriormente, foi fixado no bloco de madeira.

O bloco foi colocado no Micrótomo Criostato (300 ANCAP) e desbastado em seções de cortes de 30 μm até atingir o músculo, passando a realizar cortes de 5 μm . Retiraram-se entre 10 e 12 desbastes de 30 μm desprezando-os, os 5 cortes seguintes (cortes seriados) foram as lâminas do início da peça. Seguindo o mesmo critério de retirar entre 10 e 12 desbastes, foram obtidas as lâminas do meio e final da peça, com cortes transversais e longitudinais.

Os cortes foram colocados em banho-maria entre $39^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ para ocorrer a expansão com o Paraplast® Plus, em seguida foram retirados e montados em lâmina de vidro. Adotou-se o critério de colocar entre 6 e 8 cortes por lâmina.

As lâminas organizadas em suportes foram mergulhadas em três cubas contendo Xilol, por um tempo de 5 minutos para cada troca, sendo esta a etapa de desparafinização. A hidratação dos cortes é realizada na sequência mergulhando as lâminas em cubas contendo álcool etílico em concentrações decrescentes, iniciando com o absoluto, passando para 96%, 85%, 70% e finalizando com água corrente por 5 minutos.

A coloração dos cortes finaliza o processo, mergulhando as lâminas em uma cuba contendo Hematoxilina de Harris por 2 ½ minutos, passando por água corrente por 6 minutos, por outra cuba contendo Eosina Amarela 2% por 2 minutos e novamente por água corrente, neste caso por 5 minutos. Uma lamínula foi fixada sobre os cortes por intermédio de uma

resina, Entellan (Merck®), meio altamente refringente que serve ao mesmo tempo para aumentar a transparência dos cortes quanto para conservá-los.

Os cortes foram observados em microscópio óptico e fotografados em Câmera fotográfica *Canon PowerShot A620 7*.

Para realizar a contagem das células dos músculos diafragmas, tratados com Tyrode (controle), veneno bruto de Bjssu, extrato EDM e mistura (veneno + extrato), adotou-se o critério de padronizar o tamanho das fotografias em 20x10 cm e definir três linhas de contagem com o auxílio do software *Portable Adobe Photoshop CS3*, como mostra a Figura 6, abaixo:

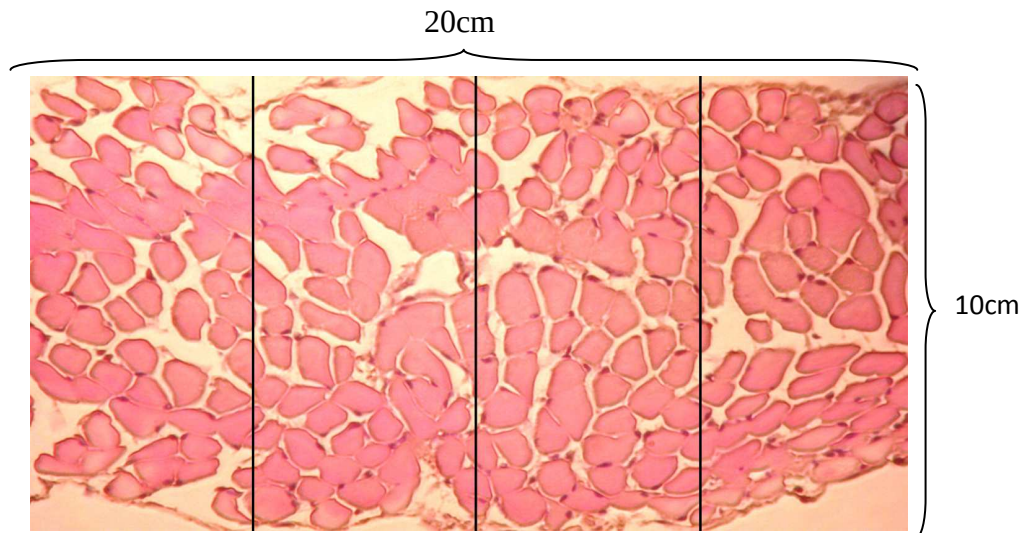


Figura 6. Lâmina pronta para contagem. Corte transversal de preparação incubada com extrato EDM (0,4 mg/mL), corada com Hematoxilina e Eosina. Objetiva 40X.

As contagens (duplo cego) das células foram realizadas por dois examinadores, seguindo critérios estabelecidos (Figura 7) para que cada examinador obtivesse o mesmo critério de análise, evitado assim diferenças discrepantes na análise estatística.

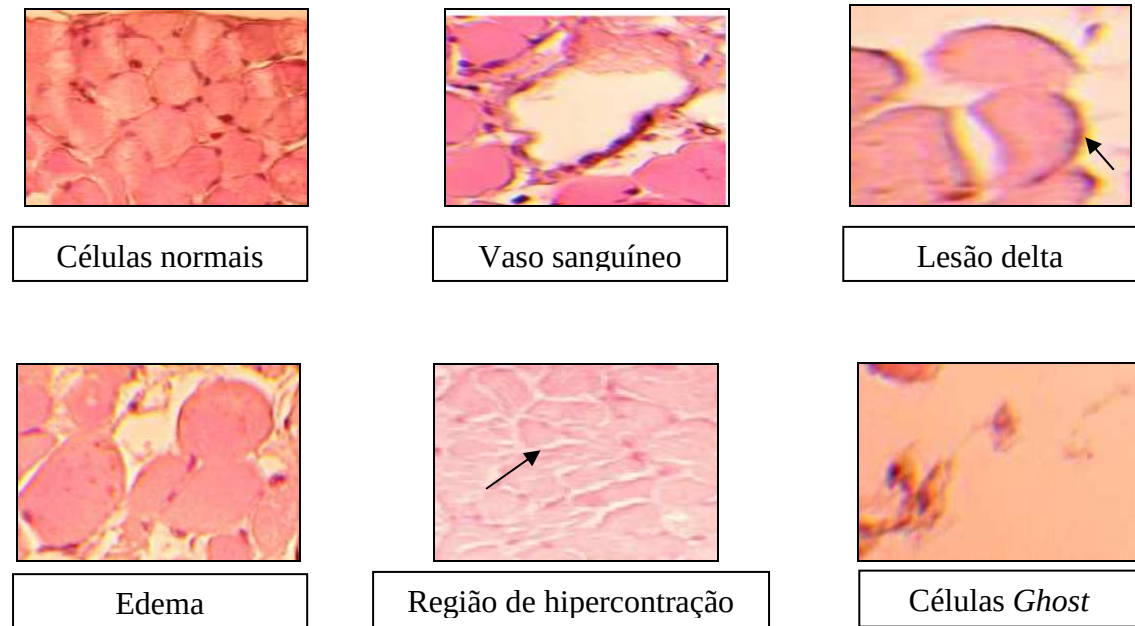


Figura 7: Caracterização do padrão utilizado para a contagem e tipos de células normais, vaso sanguíneo, lesões delta, edema, região de hipercontração e células *Ghost*.

4.5 Ensaio Toxicológico da *Plathymenia reticulata*

4.5.1 Teste de Mutagenicidade (Teste de Ames)

O resíduo seco do extrato hidroalcolico da *P. reticulata* foi solubilizado com dimetil sulfóxido (DMSO, Nuclear®) e utilizados nas concentrações 12,5 µL, 25 µL, 50 µL, 75 µL e 87,5 µL. Um conjunto de cepas histidina-dependentes (*Salmonella typhimurium*- TA97a, TA98, TA100 e TA102) foram utilizadas para testar mutagenicidade tanto na presença como na ausência do sistema de ativação metabólica – S9. A fração microsomal S9 é composta por um homogenato de células de fígado de rato, pré tratado com a mistura bifenil policlorinada (Aroclor 1254), que induz um aumento de enzimas (P-450) neste órgão. A fração S9 é acrescida de cofatores adequados e necessita de pH específico para que as reações demetabolização possam ocorrer.

Os componentes da mistura S9 padrão são MgCl₂ 8 mM, KCl 33 mM, glucose-6-fosfato 5 mM, nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADP) 4 mM, fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4 e fração microsomal S9 em uma concentração de 0,04 mL/mL da mistura.

Como controle negativo no ensaio, semeou-se a bactéria e em seguida o solvente dimetil sulfóxido (DMSO, Nuclear®) foi adicionado (na presença e ausência do sistema de ativação metabólica – S9). Como controles positivos foram utilizados compostos mutagênicos em concentrações definidas (TA97a e TA98 –S9, 4-o-nitrofenilenodiamino, +S9 2-antramine; TA100 –S9 azida sódica, +S9 2-antramine; TA102 –S9 mitomicina, +S9 2-aminofluorene).

O método utilizado foi o de pré-incubação, caracterizado por uma etapa de pré-incubação antes do plaqueamento. As culturas de bactérias e a mistura contendo a amostra teste, em presença e ausência do sistema de metabolização, foram pré-incubadas por período de 20-30 min a 37° C. Após esse tempo, adicionaram-se 2 mL de top Agar em cada um dos tubos. O conteúdo de cada tubo foi homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo agar mínimo com trações de histidina e biotina. Após solidificação do top Agar, as placas foram incubadas invertidas, por 48 horas, à 37° C. Procedeu-se à contagem do número de revertentes por placa. O ensaio foi realizado em triplicata.

A Figura 8, abaixo ilustra as etapas do estudo.

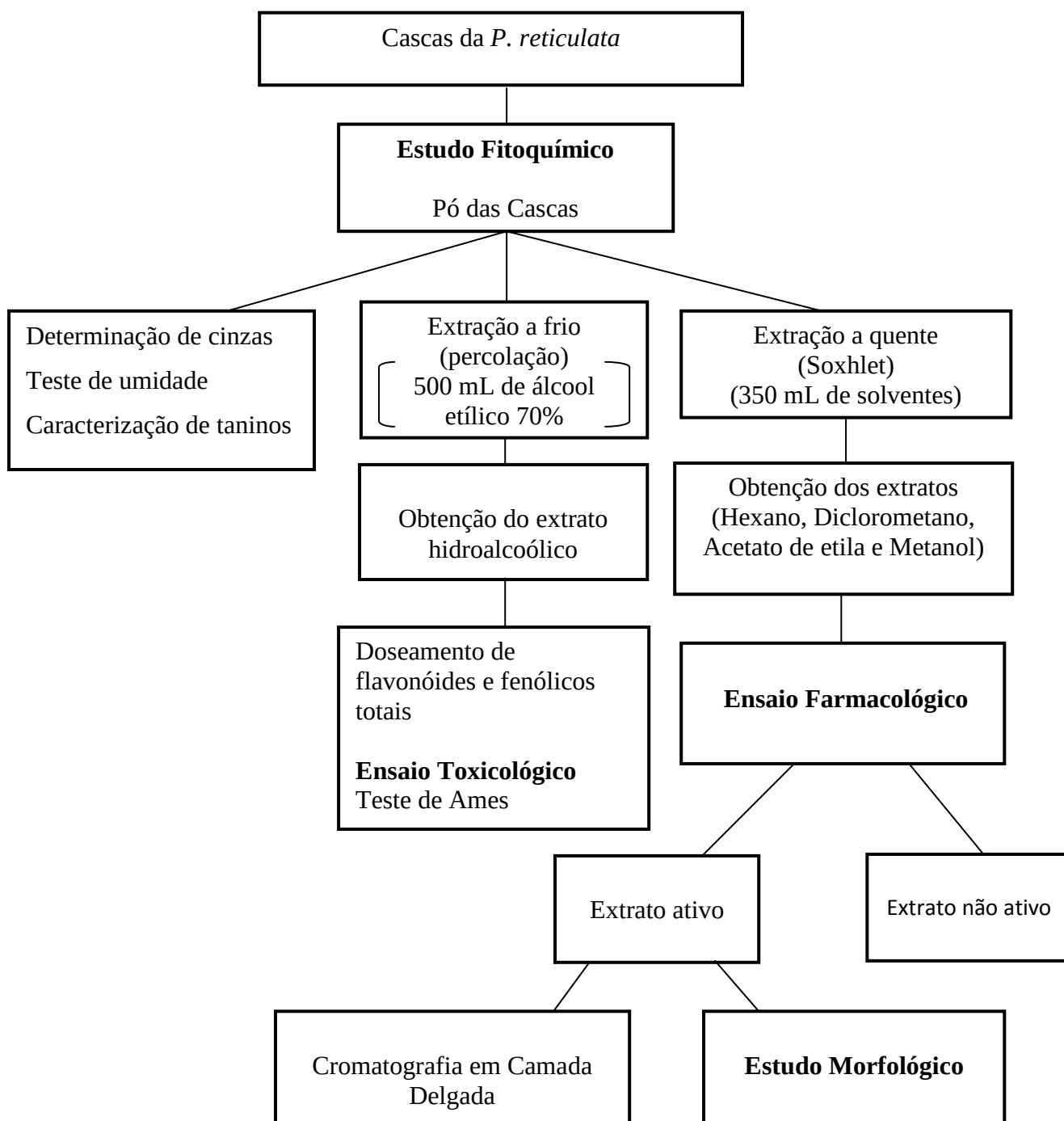


Figura 8. Representação esquemática das etapas realizadas no estudo.

4.6 Análise Estatística

Para a avaliação estatística dos resultados obtidos no estudo toxicológico, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), através do programa *Salanal*, desenvolvido pelo *Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, N. C. USA*.

Os resultados farmacológicos e histológicos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste não-pareado *t*-Student, com valor $p < 0,05$ considerado como significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo Fitoquímico

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença, através de várias etapas que envolvem desde a coleta, a preparação do material vegetal, a extração, as análises fitoquímicas preliminares, o fracionamento, isolamento e purificação de substâncias até a elucidação estrutural (SONAGLIO et al., 2000). Neste estudo, análises fitoquímicas preliminares de pó das cascas, do extrato hidroalcoólico e de extratos de diferentes polaridades de *Plathymenia reticulata* foram realizadas e os resultados estão descritos a seguir.

Em relação ao teor de cinzas e umidade, a droga apresentou 5,7% de cinzas e 0,14% de umidade. Na série de reações gerais realizadas para caracterizar taninos foram obtidos os seguintes resultados: positividade na reação A visualizada através de uma coloração azul violácea, indicando a presença de taninos hidrolisáveis; positividade nas reações B, C e D indicadas pela formação de precipitados.

Os ensaios específicos para caracterização dos taninos hidrolisáveis, condensados e catequinas resultaram em positivos, respectivamente pela precipitação dos taninos gálicos, pela formação de precipitado róseo, e pela coloração vermelho-vinho no palito de dente ao final do teste.

A concentração de fenólicos totais foi calculada a partir de uma curva padrão de pirogallol (Figura 9), através da equação da reta $y = 0,135x + 0,0356$ (y = absorvância e x = concentração $\mu\text{g/mL}$), obtendo-se como resultado $3,0029 \mu\text{g/mL}$. A porcentagem de fenólicos totais presente na amostra do extrato hidroalcoólico da *P. reticulata* foi de **3,8 g%**.

A concentração de flavonóides foi calculada através de uma curva padrão de quercetina (Figura 10), através da equação da reta $y = 0,0632x + 0,0035$, obtendo-se como resultado $1,25950 \mu\text{g/mL}$. A porcentagem de flavonóides totais presente na amostra foi de **0,16 g%**.

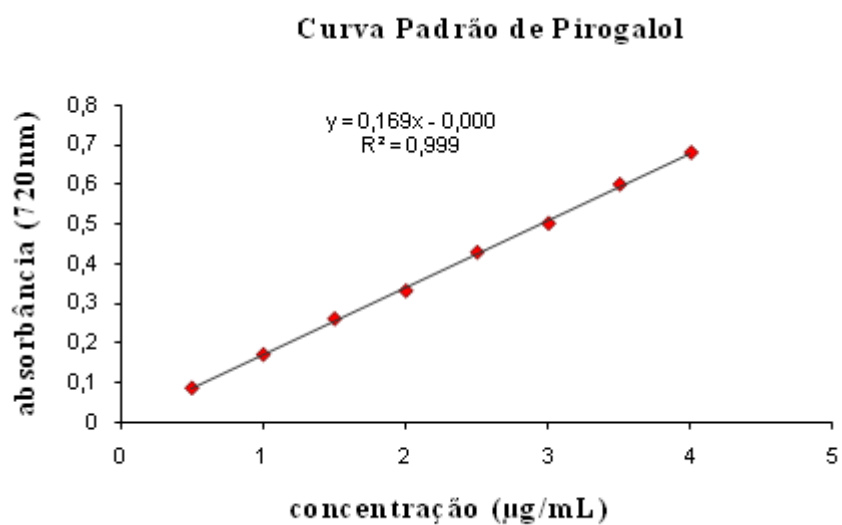


Figura 9. Curva padrão de Pirogalol.

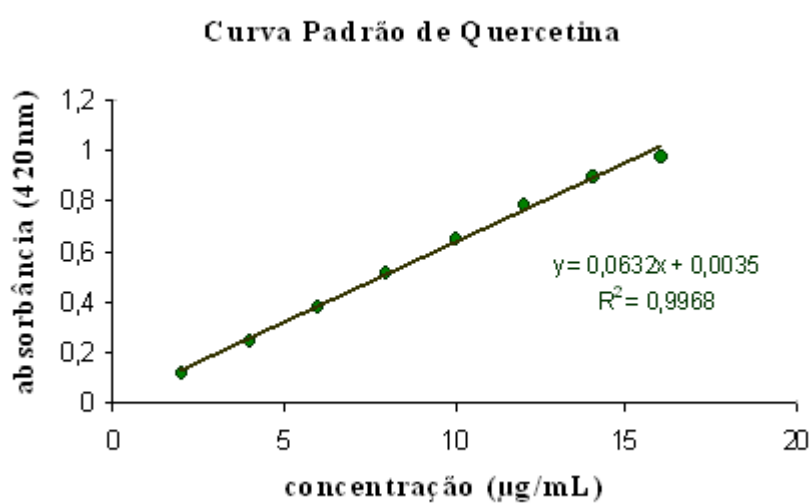


Figura 10. Curva padrão de Quercetina.

O rendimento dos extratos da *P. reticulata* provenientes da extração via Soxhlet com os solventes hexano (EHEx), diclorometano (EDM), acetato de etila (EAET) e metanol (EMET) foram, respectivamente (em %): 1,09; 1,15; 1,98 e 1,39.

As Figuras 11, 12 e 13 ilustram o perfil cromatográfico obtido com os extratos EHEX, EDM, EAET e EMET obtidos da casca da *P. reticulata* frente aos padrões fitoquímicos comerciais: ácido caféico, ácido clorogênico, rutina, ácido tânico, apigenina, atropina, β -sitosterol, cumarina, naringenina, quercetina. Nas Figuras 11A e 11B há a indicação de compostos fenólicos como ácido caféico, ácido tânico e ácido clorogênico no EAET. Já na Figura 12, note a indicação de compostos fenólicos no EDM além do ácido tânico no EAET. A Figura 13 indica a presença de apigenina no EAET e EDM, o ácido caféico no EHEX e o ácido tânico no EMET.

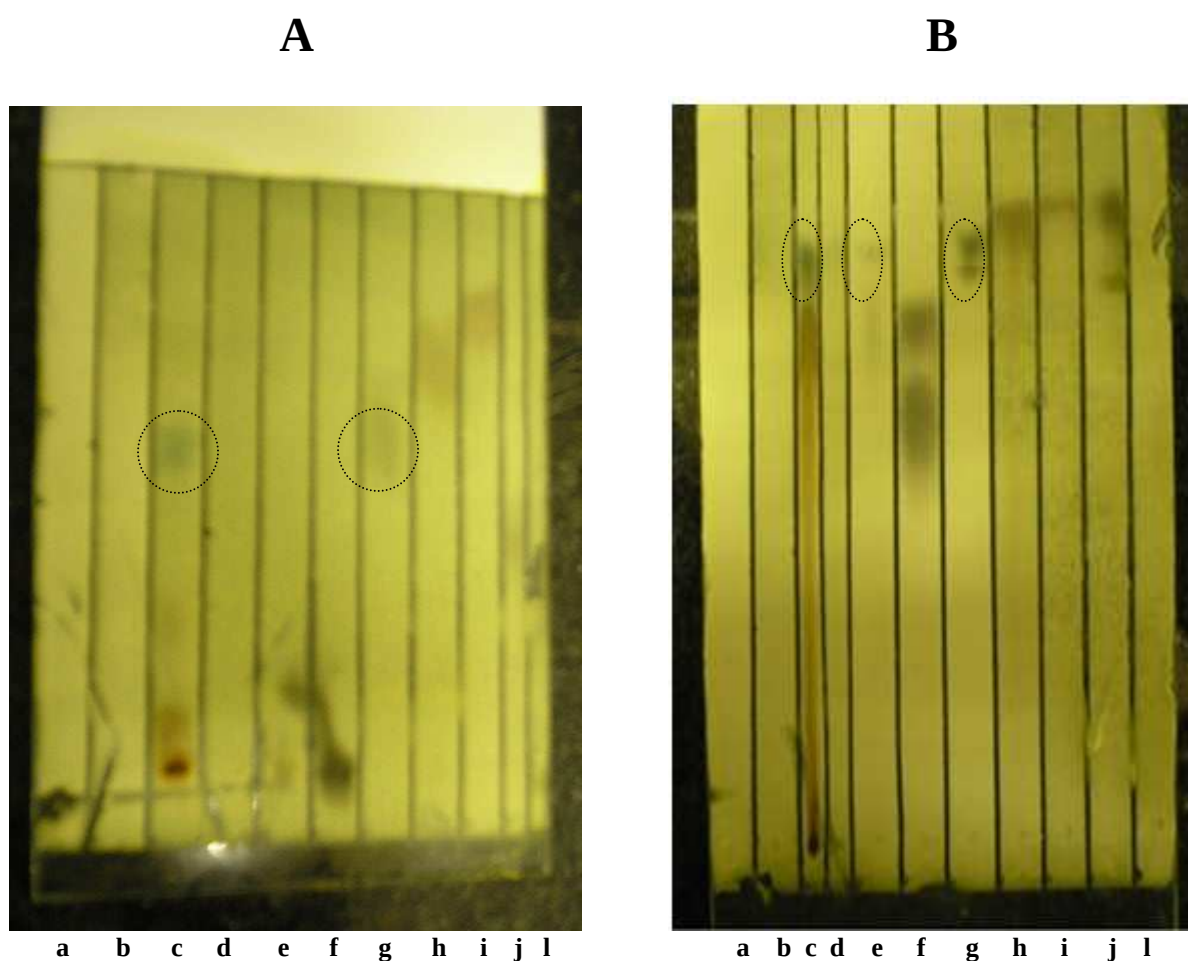


Figura 11: Cromatografia em camada delgada dos extratos da *P. reticulata*. Sistema solvente: A: acetona (10%); clorofórmio (75%); ácido fórmico (8%); B: acetato de etila (100%); ácido fórmico (11%); ácido acético glacial (11%); água (27%). Revelador Cloreto Férrico (FeCl_3). Extratos: EHEX (a), EDM (b), EAET (c), EMET (d); padrões: (e), ácido tânico; (f), ácido clorogênico; (g), ácido caféico; (h), apigenina; (i), naringenina; (j), quercetina; (l), rutina.



Figura 12. Cromatografia em camada delgada dos extratos da *P. reticulata*. Sistema solvente: acetona (10%); clorofórmio (75%); ácido fórmico (8%). Revelador NEP/PEG. Extratos: EHEX (b), EDM (d), EAET (f), EMET (h); padrões: (a), ácido caféico; (c), ácido tânico; (e), ácido clorogênico e (g), rutina.

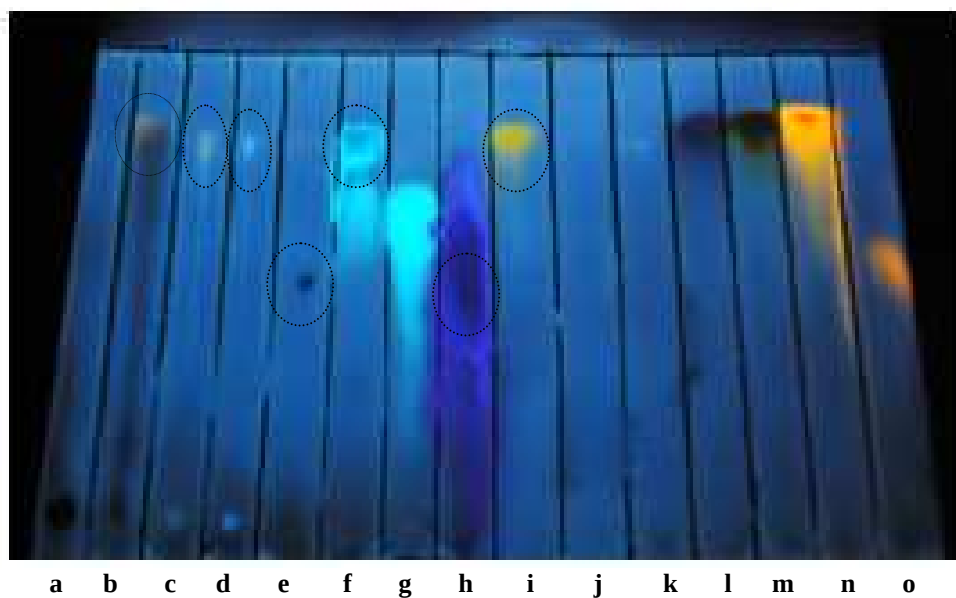


Figura 13. Cromatografia em camada delgada dos extratos da *P. reticulata*. Sistema solvente: acetato de etila (100%); ácido fórmico (11%); ácido acético glacial (11%); água (27%) Revelador NP/PEG. Extratos: EHPr (a), EAET (b), EDM (c), EHEX (d), EMET (e); padrões: (f), ácido caféico; (g), ácido clorogênico; (h) ácido tânico; (i) apigenina, (j) atropina, (k), β -sitosterol; (l), cumarina, (m) naringenina, (n) quercetina, (o) rutina.

Para a determinação do teor de taninos presente no extrato metanólico utilizou-se uma curva padrão de ácido tânico (Figura 14), através da equação da reta $y = 0,673x - 0,173$, obtendo como resultado 1,20 g%.

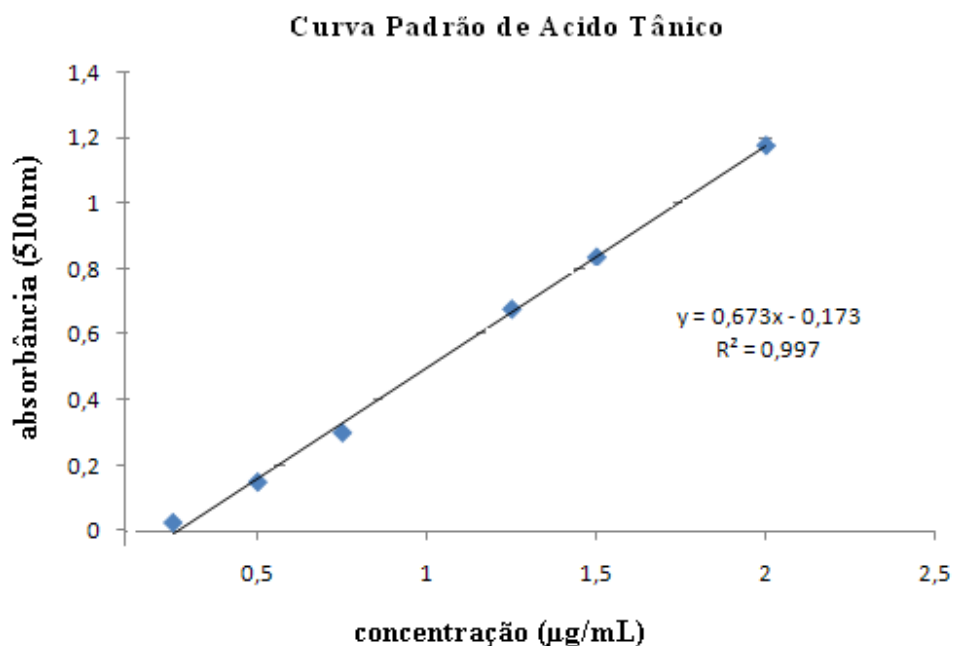


Figura 14. Curva padrão do ácido tânico.

5.2 Estudo Farmacológico

A atividade farmacológica de uma planta com potencial medicinal é sempre requerida e deve ser validada cientificamente. Neste estudo, a atividade antibotrópica da *P. reticulata* foi testada contra o veneno bruto da serpente *Bothrops jararacussu*, cuja ação proteolítica causa severa mionecrose e bloqueio neuromuscular *in vitro*.

Na sequência deste estudo seguem-se os resultados farmacológicos obtidos com os extratos da planta, com o veneno, e com a mistura veneno + extratos da planta pré incubados por 15 min. antes de sua adição à cuba contendo a preparação isolada.

A Figura 15 ilustra o efeito farmacológico dos extratos (A) EHEX, (B) EDM, (C) EAET e (D) EMET, em diferentes concentrações (0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL), nas preparações neuromusculares, comparados ao controle (Tyrode). Note que ao final dos 120

min. de experimento os extratos nas concentrações utilizadas não bloquearam a resposta contrátil significativamente quando comparados ao controle (solução Tyrode).

A Figura 16 ilustra registros miográficos representativos de: (A) preparação sob estímulo indireto exposta à solução nutritiva (controle); note a preservação da resposta contrátil basal durante todo o período de observação. (B) preparação sob estímulo indireto exposta ao veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (40 µg/mL); note a intensa contratura que este veneno produz (elevação da linha de base), característica de *Bothrops*, mostrando dificuldade de relaxamento a cada estímulo recebido e o bloqueio neuromuscular progressivo que se instala até o bloqueio total da preparação. Este bloqueio é dito irreversível, pois mesmo após a lavagem da preparação (e suposta retirada do veneno) e substituição da solução por uma nova, a reversão da resposta contrátil não ocorre.

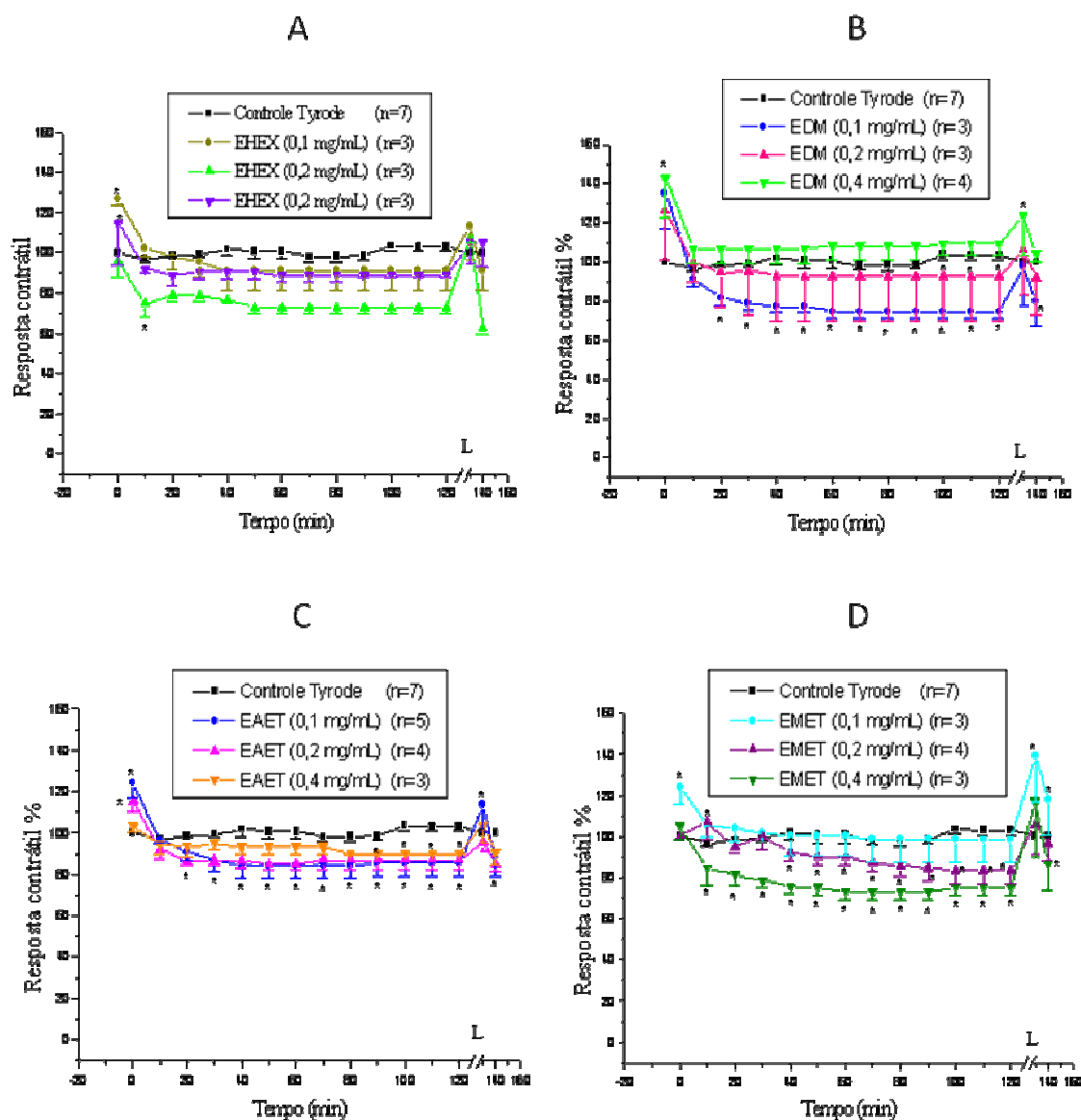


Figura 15. Efeito farmacológico dos extratos da *P. reticulata* em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob estímulo indireto. A, B, C e D representam os extratos EHEX, EDM, EAET e EMET, respectivamente, nas concentrações de 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média dos experimentos (* $p < 0,05$ no ponto indicado e demais subsequentes, em relação ao controle Tyrode).

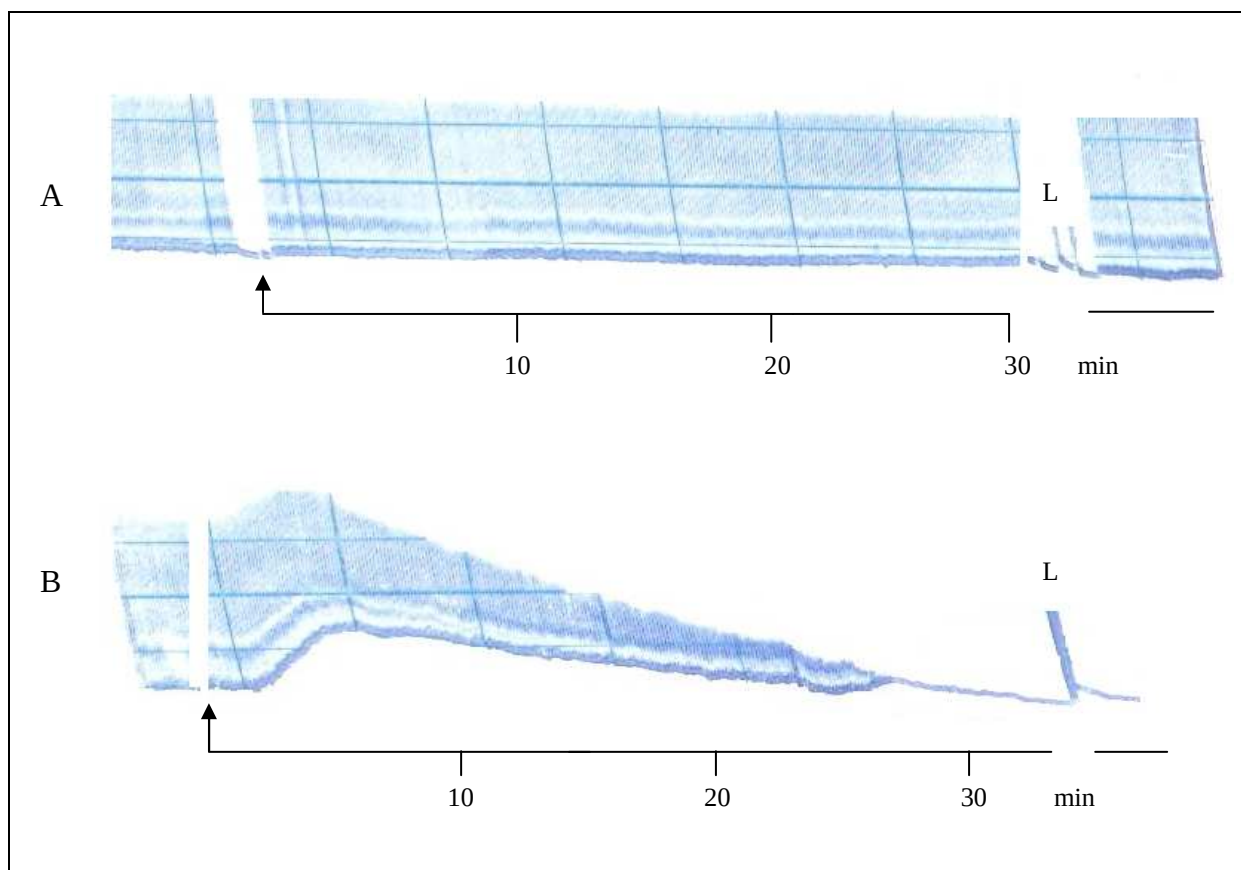


Figura 16. Registros miográficos de preparações nervo frênico-diafragma de camundongos, sob estímulo indireto, sendo (A) tyrode (controle) e (B) tratada com veneno bruto da Bjssu ($40 \mu\text{g/mL}$). Flecha: momento da adição do veneno.

Os ensaios de neutralização do efeito bloqueador do veneno de Bjssu (40 µg/mL) pelos extratos EHEX, EDM, EAET e EMET nas concentrações (A) 0,1 mg/mL; (B) 0,2 mg/mL; e (C) 0,4 mg/mL são mostrados na Figura 17.

Note que na concentração de 0,1 mg/mL (Figura 17A) os extratos não foram capazes de neutralizar o veneno Bjssu. O EDM foi o que apresentou um melhor efeito, porém em um dado tempo, não foi eficaz em sua proteção.

Na concentração de 0,2 mg/mL (Figura 17B) o EDM apresentou uma proteção maior quando comparado ao veneno bruto de Bjssu (* $p < 0,05$). Os demais extratos quando comparados estatisticamente com o EDM, apresentaram diferença significativa na maioria dos pontos analisados.

Na concentração de 0,4 mg/mL (Figura 17C) pode-se verificar uma potente ação neutralizante de todos os extratos sobre o efeito do veneno. Quando os extratos foram comparados com o EDM, todos apresentaram diferença significativa (* $p < 0,05$). O EDM, por sua vez, quando comparado à solução Tyrode (controle), não apresentou diferença estatística. No mesmo ensaio, os EHEX e EAET, não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si.

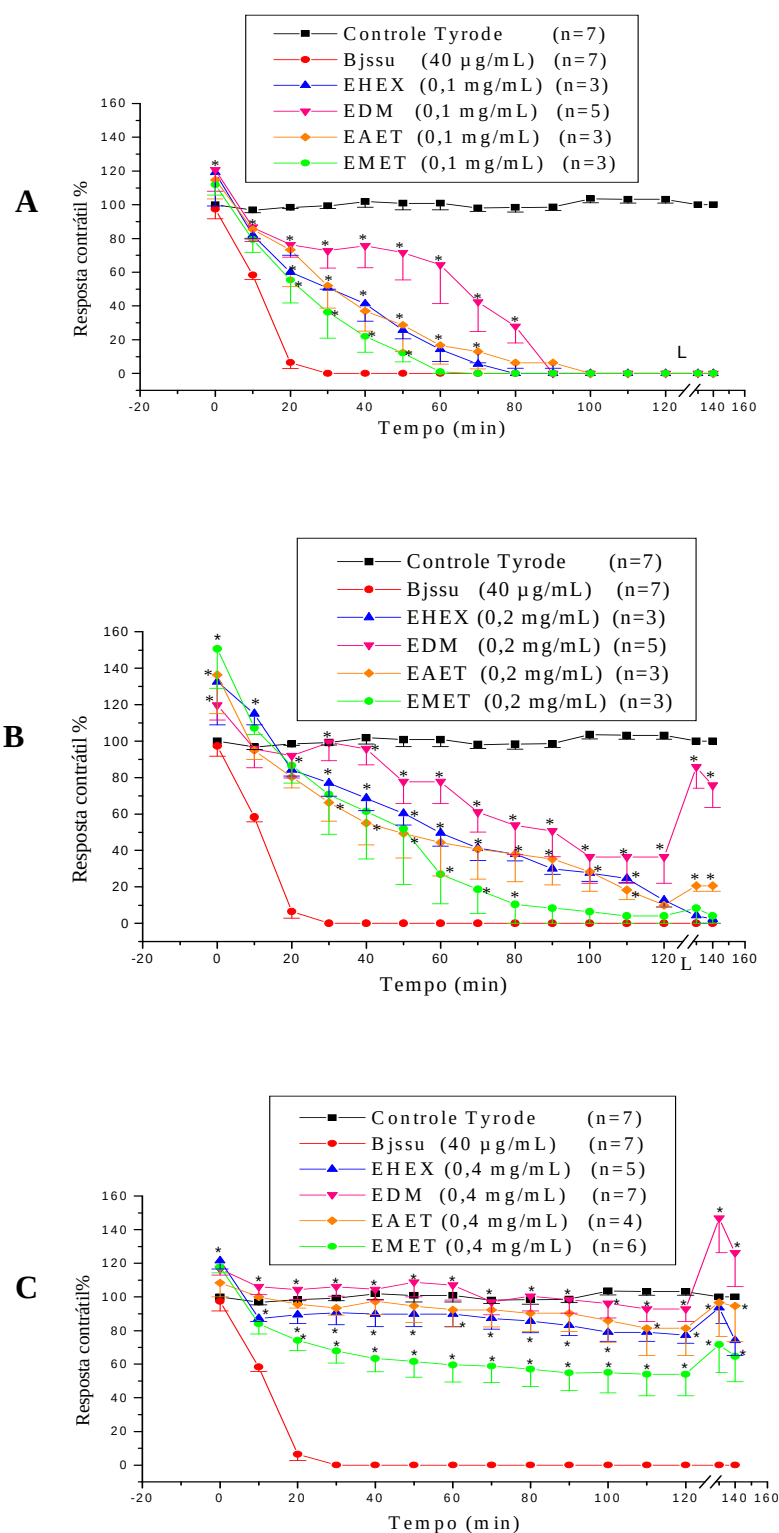


Figura 17. Ação farmacológica dos extratos da *P. reticulata* em mistura com o veneno bruto da Bjssu (40 μ g/mL), em preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob estímulo indireto. A, B e C representam as concentrações dos extratos de 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; e 0,4 mg/mL, respectivamente. Cada ponto representa a média $\pm$ o erro padrão de média dos experimentos (* $p < 0,05$ no ponto indicado e demais subsequentes, em relação ao veneno Bjssu).

5.3 Estudo Morfológico dos Músculos Diafragmas

Os músculos foram tratados durante 120 min. com solução de Tyrode (controle), veneno bruto de Bjssu, EDM e com a mistura (veneno + EDM) e avaliados morfológicamente através de microscopia óptica de luz, com o objetivo de analisar quantitativamente o dano muscular nas fibras, causado pelo efeito miotóxico do veneno.

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), através do programa *Salanal*, desenvolvido pelo *Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park*, N. C. USA. A Tabela 1 ilustra a média do dano morfológico nos músculos obtidos em cada tratamento, segundo o *software* estatístico.

Tabela1: Valores do índice de miotoxicidade da contagem das células dos músculos tratados com Tyrode (controle), veneno bruto de Bjssu, extrato EDM e mistura (veneno + extrato).

Preparação exposta a diferentes tratamentos	N	Média	Erro padrão (±)
Controle Tyrode	2	15.9%	0,8
EDM (0,4 mg/mL)	3	29,1%	1
Veneno bruto de Bjssu (40 µg/mL)	3	58,4%	1
EDM (0,4 mg/mL) + Veneno bruto de Bjssu (40 µg/mL)	3	33,8%	1

EDM, extrato diclorometano. Bjssu, *Bothrops jararacussu*. N = número de experimentos realizados)

Nos músculos incubados com solução de Tyrode (Figura 18A) pode-se verificar que as fibras musculares apresentam-se dispostas de forma organizada em rearranjo poligonal, núcleos periféricos localizados abaixo do sarcolema, alternando-se com alguns pequenos espaços vazios e alguns núcleos soltos (seta, células “ghost”), além de edema (E), lesões delta (LD), regiões de hipercontração (H) e condensação de miofibrilas.

Os músculos incubados com o EDM (0,4 mg/mL) (Figura 18B) apresentaram as fibras musculares dispostas de forma mais desorganizada, além de algumas alterações no formato das fibras características de lesão delta (LD), apresentando também núcleos soltos (seta, células “ghost”).

O veneno bruto de Bjssu, na concentração de 40 µg/mL induziu mionecrose nas fibras (Figura 18C). Os espaços vazios representam áreas de perda de fibras, por ação miotóxica do veneno, além de alterações morfológicas, representadas por edema (E), lesões delta (LD) e presença de núcleos soltos e restos de membranas (seta, células “ghost”).

A Figura 18D ilustra músculos resultantes da exposição à mistura pré incubada (veneno 40 µg/mL + EDM 0,4 mg/mL), mostrando que o EDM reduziu em 58,2% a mionecrose causada pelo veneno sozinho. A Figura 18D mostra que mesmo sob a presença do EDM ainda se observam alguns espaços opticamente vazios, núcleos soltos e restos de membrana (seta, células “ghost”), alterações no aspecto poligonal de algumas fibras como edema (E) e lesão delta (LD).

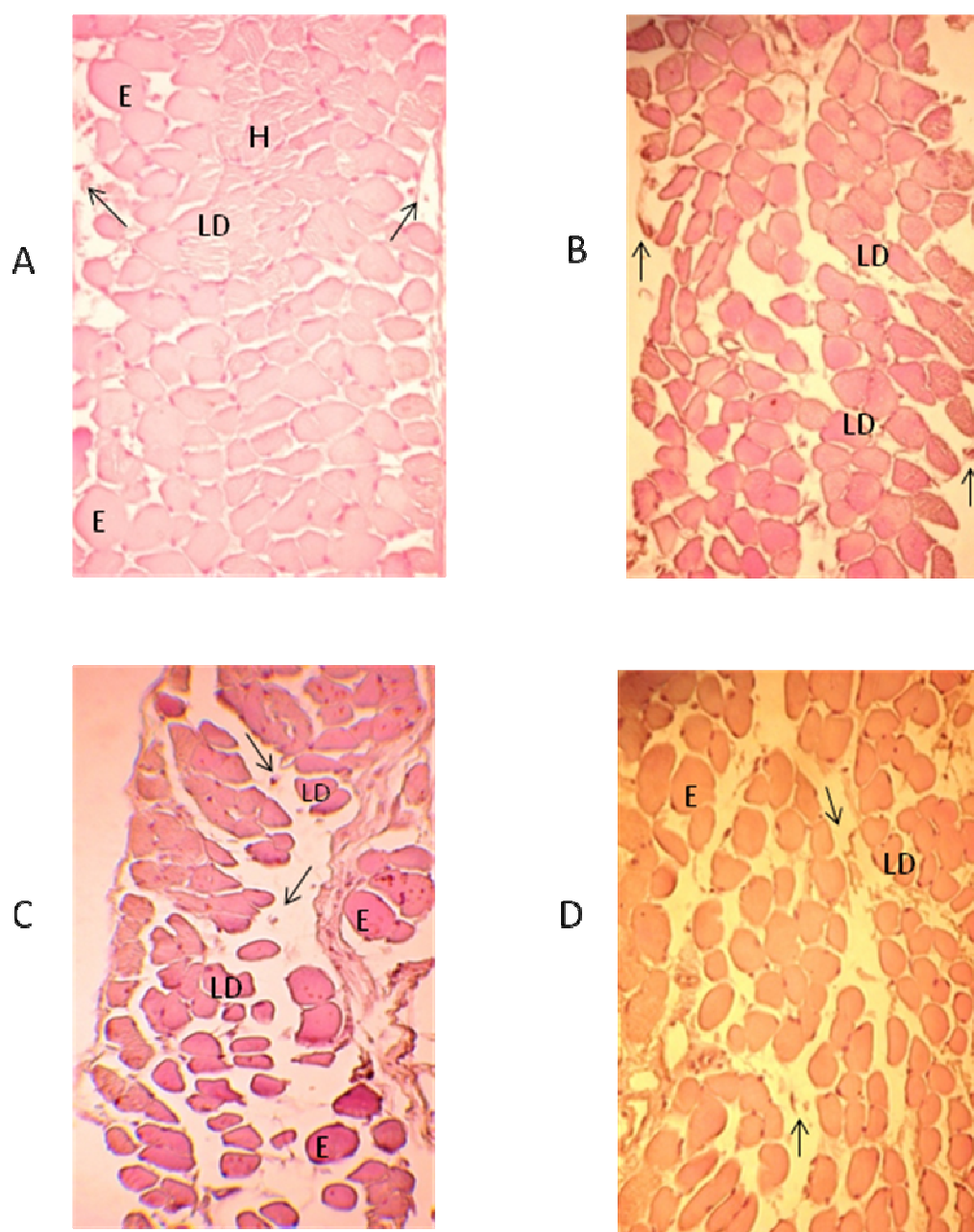


Figura 18. Corte transversal de preparação incubada com: A, solução de Tyrode (controle), B (EDM 0,4 mg/mL), C (veneno bruto de Bjsu 40 µg/mL) e D (veneno de bjsu 40 µg/mL + EDM 0,4 mg/mL), observada no tempo de 120 min. Note o dano muscular causado pelo veneno e a ação protetora do EDM, sobre as fibras lesadas, considerando (E) lesão do tipo edema, (LD) lesão do tipo delta, (H) região de hipercontração e condensação de miofibrilas e (seta) região com núcleos soltos e restos de membrana. Objetiva 40x.

5.4 Estudo Toxicológico

5.4.1 Teste de mutagenicidade (Teste de Ames)

Os resultados foram expressos em revertentes/placa ou pela razão de mutagenicidade (RM), também denominada de índice de mutagenicidade (IM), razão entre o número de revertentes na placa- teste (induzidos mais espontâneos) e o número de revertentes na placa- controle (espontâneos). Permite-se, assim, a comparação de resultados entre diferentes linhagens. Para a avaliação estatística dos resultados e para o estudo das diferenças entre doses e entre repetições utilizou-se a análise de variância (ANOVA), através do programa *Salanal*, desenvolvido pelo *Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, N. C. USA*.

A Tabela 2 mostra os resultados sem ativação metabólica (expressos em média $\pm$ desvio padrão) obtidos com diferentes concentrações do EHPr frente às linhagens bacterianas *Salmonella typhimurium* TA98, TA97a, TA100 e TA102. O EHPr foi considerado mutagênico para a linhagem TA98 nas concentrações de 5,00 μ L e 7,50 μ L (índice de mutagenicidade $\geq$ a 2, tendo sido respectivamente 2,0 e 2,4) e apresentou indícios de mutagenicidade para as linhagens TA97a e TA102 (índice de mutagenicidade inferior a 2 e $p < 0,05$).

Tabela 2. Atividade mutagênica expressa pela média $\pm$ desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens bacterianas TA98, TA97a, TA100 e TA102 expostas ao EHPr, em várias concentrações sem (-S9) ativação metanólica.

Tratamentos μ L/placa	Revertentes /placa de linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>			
Extrato	TA98 -S9 ^a	TA97a -S9 ^a	TA100 -S9 ^b	TA102 -S9 ^b
0	22 $\pm$ 4,0	122 $\pm$ 21,5	127 $\pm$ 1,5	190 $\pm$ 18,9
1,25	19 $\pm$ 1,5 (0,8)	171 $\pm$ 25,2 (1,4)	172 $\pm$ 30,1 (1,3)	255 $\pm$ 8,1** (1,5)
2,50	31 $\pm$ 6,1 (1,4)	183 $\pm$ 10,0* (1,5)	134 $\pm$ 19,0 (1,0)	289 $\pm$ 25,5** (1,8)
3,75	31 $\pm$ 11,1 (1,4)	203 $\pm$ 15,3* (1,7)	153 $\pm$ 23,7 (1,2)	220 $\pm$ 20,6 (1,2)
5,00	44 $\pm$ 11,2 (2,0)	210 $\pm$ 15,9* (1,7)	171 $\pm$ 17,2* (1,3)	208 $\pm$ 9,2 (1,2)
7,50	54 $\pm$ 10,9* (2,4)	223 $\pm$ 10,7** (1,8)	173 $\pm$ 77,4 (1,3)	233 $\pm$ 21,1 (1,3)
Controle +	1885 $\pm$ 126,5	1251 $\pm$ 44,2	1157 $\pm$ 207,6	886 $\pm$ 122,6

Extrato: extrato hidroalcoólico da *P. reticulata*; 0= controle negativo (DMSO – 100 μ L/placa). Control +: controle positivo: ^a NPD (4-nitro-*o*-fenilenodiamina – 10,0 μ g/placa); ^b Azida sódica (1,25 μ g/placa). * $p < 0,05$ (ANOVA). Os valores entre parênteses correspondem aos índices de mutagenicidade.

A Tabela 3 ilustra os resultados obtidos nos ensaios com ativação metabólica. O EHPr não apresentou ação mutagênica a nenhuma das linhagens testadas. Pode-se verificar que, em todas as concentrações testadas, o EHPr não apresentou diferença estatística significativa e os índices de mutagenicidade foram inferiores a 2.

Tabela 3. Atividade mutagênica expressa pela média $\pm$ desvio padrão do número de revertentes/placa em linhagens bacterianas TA98, TA97a, TA100 e TA102 expostas ao EHPr, em várias concentrações com (+S9) ativação metanólica.

Tratamentos $\mu\text{L/placa}$	Revertentes /placa de linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>			
Extrato	TA98 +S9 ^c	TA97a +S9 ^c	TA100 +S9 ^c	TA102 +S9 ^d
0	25 $\pm$ 3,6	NR	NR	272 $\pm$ 21,5
1,25	19 $\pm$ 0,6 (0,7)	NR	NR	257 $\pm$ 9,2 (0,9)
2,50	24 $\pm$ 0,6 (0,9)	NR	NR	243 $\pm$ 21,4 (0,8)
3,75	20 $\pm$ 6,4 (0,8)	NR	NR	226 $\pm$ 11,3 (0,8)
5,00	25 $\pm$ 6,0 (1,0)	NR	NR	221 $\pm$ 22,9 (0,8)
7,50	22 $\pm$ 0,8 (0,8)	NR	NR	192 $\pm$ 13,3 (0,7)
Controle +	733 $\pm$ 127,8	NR	NR	854 $\pm$ 59,9

Extrato: extrato hidroalcoólico da *P. reticulata*; 0= controle negativo (DMSO – 100 $\mu\text{L/placa}$). Controle +: controle positivo: ^c 2-Antramina (1,25 $\mu\text{g/placa}$) ^d Mitomicina (0,5 $\mu\text{g/placa}$)* $p < 0,05$ (ANOVA). Os valores parênteses correspondem aos índices de mutagenicidade. NR= não realizado.

DISCUSSÃO

A *Plathymenia reticulata* Benth ou vinhático causou interesse na comunidade científica após os estudos de Fernandes (2002), que pesquisou suas propriedades antiinflamatória, antimicrobiana e antiproliferativa (em linhagem celular de ovário e pulmão). A abordagem adotada neste estudo foi analisá-la contra as ações biológicas do veneno bruto da serpente *Bothrops jararacussu*, a partir das premissas de que uma planta com ação antiinflamatória tem elevado potencial antiofídico (SOARES et al., 2005) e de que as aplicabilidades de uma planta medicinal são inesgotáveis.

O pó de cascas de *P. reticulata* foi caracterizado fitoquimicamente com vistas à certificação do material vegetal. O estudo fitoquímico compreende as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis ou não, pela ação biológica. Esses conhecimentos permitem identificar a espécie vegetal e, conjuntamente com ensaios de atividade biológica, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas. (SONAGLIO et al., 2000)

Nas análises para caracterização fitoquímica de uma droga, alguns critérios, tais como a presença de elementos estranhos à amostra, teor de umidade, resíduos de pesticidas e de metais pesados, entre outros, são frequentemente estabelecidos nas farmacopéias de forma genérica para todas as amostras vegetais (SONAGLIO et al., 2000). Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), os valores estabelecidos para drogas vegetais são de 14% (teor de umidade) e 4% (teor de cinzas). Os resultados obtidos através da análise do pó da *P. reticulata* mostraram que o teor de umidade encontrava-se dentro do estabelecido, enquanto o teor de cinzas encontrava-se um pouco acima. A determinação do teor de cinzas permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes. O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas que degradam os constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias. (FARIAS, 2000)

Os processos de fracionamento de extratos vegetais com vistas ao isolamento de substâncias ativas podem ser monitorados por ensaios direcionados para a avaliação da atividade biológica. A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise tanto dos extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado

de um processo de separação (SONAGLIO et al., 2000). Neste estudo, os extratos EHEX, EDM, EAET e EMET foram identificados por CCD e permitiu indicar a presença de grupos fenólicos e flavonóides, nos extratos EAET e EDM.

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Esses compostos possuem também importância farmacológica, resultante de algumas propriedades importantes atribuídas a alguns representantes dessa classe, como por exemplo: anticarcinogênico, antiinflamatório, antialérgico, antiulcerogênico, antivirais, entre outros. (ZUANAZZI, 2000)

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um agrupamento hidroxila. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, contribuindo para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais e nos microrganismos, fazendo também parte do metabolismo animal. Para alguns derivados de ácidos fenólicos têm sido relatada atividade antioxidante, como para o ácido clorogênico, para o ácido caféico e seus ésteres com esteróis e triterpenos. (SILVA; SILVA, 1999)

Os taninos são compostos fenólicos solúveis em água, com alto peso molecular e podem ser divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (SILVA; SILVA, 1999). Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como: diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e processos inflamatórios em geral. (HASLAM, 1996)

Essas análises apresentadas, através de diferentes técnicas, finalizam os estudos fitoquímicos realizados com a *P. reticulata*, indicam coerência com os dados presentes na literatura, além de servir como suporte para os ensaios farmacológicos e toxicológicos.

Para avaliar a atividade biológica de uma planta devem-se incluir os ensaios farmacológicos e toxicológicos de substâncias isoladas, de frações obtidas ou extratos totais da droga vegetal (SONAGLIO et al., 2000). Uma atenção especial tem sido dada à investigação de plantas buscando a que concentra os principais compostos bioativos (folhas, caules, raízes, cascas, etc) capazes de neutralizar os efeitos dos venenos de serpentes. (MORS et al., 2000)

Estudos recentes realizados por Melo et al. (2009) (Anexo B) com o extrato hidroalcoólico das cascas da *P. reticulata* (0,06 mg/mL) revelaram que a planta exerce um efeito inibitório *in vitro*, reduzindo em $79,3 \pm 9,5\%$ a neurotoxicidade induzida pelo veneno

bruto da *Bothrops jararacussu*. Os autores relacionaram tal efeito do extrato ao tanino presente, que pode ser confirmado após ensaios com o fitoquímico comercial que impediu o bloqueio da contração muscular.

Neste estudo, a proteção contra o veneno, verificado em todos os extratos (*p<0,05, em relação ao EDM), levanta uma questão bastante interessante. Até o momento, os resultados publicados na literatura com relação à atividade antibotrópica da *P. reticulata in vitro* contra o veneno bruto Bjssu associam tal proteção ao tanino, presente na espécie (MELO et al., 2009). Através da CCD realizada neste estudo com os extratos, pode-se indicar a presença de outros compostos fenólicos, como ácido caféico, ácido clorogênico, além de flavonóides que talvez possam também estar associados à atividade da espécie.

Outro fator que não pode ser desconsiderado é a quantidade desses compostos nos extratos, verificado pela relação dose-efeito, uma vez que em concentrações menores, nenhum dos extratos foi capaz de neutralizar o efeito do veneno.

Entre os extratos analisados neste estudo, o EDM foi o que melhor representou a proteção reduzindo em $92 \pm 6,2\%$ a ação neurotóxica *in vitro* do veneno bruto de Bjssu em comparação aos outros extratos (*p<0,05), apresentando-se muito próximo ao valor observado das preparações incubadas com Tyrode (controle).

A capacidade antibotrópica demonstrada pela *P. reticulata*, sob o parâmetro da junção neuromuscular, contra o veneno bruto da Bjssu é de grande valor científico, pois esse veneno causa um efeito neurotóxico *in vitro* como também exibe uma intensa atividade proteolítica, evidenciada pela miotoxicidade. Sabe-se que a soroterapia é o único método eficaz comprovado no tratamento dos acidentados, desde que instituída a tempo, dose e via de administração adequada (BRASIL, 2001). Porém, apesar da eficiência da soroterapia na neutralização dos efeitos sistêmicos, este tratamento contribui pouco para a melhoria do quadro local, resultando no aparecimento de seqüelas graves e perda tecidual. (CARDOSO et al., 2003)

Frente ao exposto, os músculos diafragmas utilizados nos ensaios farmacológicos, executados neste trabalho, foram submetidos à análise histológica para quantificar o dano morfológico *in vitro* causado pela ação miotóxica induzida pelo veneno bruto da Bjssu nas fibras musculares e a proteção do EDM contra o efeito do veneno. A mionecrose observada nas fibras musculares, decorrentes da ação das miotoxinas presentes no veneno, encontra-se bem descrita na literatura. (RODRIGUES-SIMIONI; BORGESE; CECCARELLI, 1983; CINTRA-FRANCISCHINELLI, 2008)

Entretanto, o estudo histológico com a *P. reticulata* para avaliação de sua proteção contra a ação miotóxica do veneno é inédito, destacando assim sua importância neste trabalho, completando os resultados obtidos no estudo farmacológico já descrito anteriormente. Sabe-se que, entre os efeitos do veneno de Bjssu, a ação miotóxica é a mais característica, podendo ser confirmada ao considerar os aspectos clínicos do envenenamento botrópico, caracterizado pelas severas lesões no local da picada, evoluindo ao edema de todo membro, podendo chegar à necrose. (RODRIGUES-SIMIONI; BORGESE; CECCARELLI, 1983; CINTRA-FRANCISCHINELLI, 2008)

Ao considerar os resultados dos estudos farmacológicos e histológicos, nota-se que existe uma correlação positiva entre eles, porém de forma desigual. Nos ensaios farmacológicos verificou-se uma proteção contra a neurotoxicidade do veneno superior à proteção observada no estudo histológico contra a miotoxidade do veneno. Mesmo com 33% das fibras musculares lesadas, a preparação nervo frênico-diafragma apresentou-se bastante resistente durante o estudo neurotóxico, demonstrando a proteção do EDM contra o efeito do veneno.

Resultados bastante promissores com a *Plathymenia reticulata* Benth podem ser verificados nos estudos abordados até o momento neste trabalho, o que despertou interesse em avançar nas análises, investigando o grau de segurança de seu uso, ou até mesmo uma nova aplicabilidade do extrato dessa espécie. A avaliação dos efeitos mutagênicos de compostos provenientes de plantas é, sem dúvida, uma atividade fundamental para a redução dos riscos de exposição a esses agentes.

Atualmente, as principais hipóteses sobre os mecanismos de ação de substâncias que provocam câncer estão baseadas na indução de mutações em células somáticas. Praticamente todos os agentes mutagênicos químicos e físicos capazes de provocar câncer e induzir danos no DNA celular resultam na geração de mutações de diferentes tipos. Dessa forma, torna-se essencial dispor de métodos confiáveis, simples e rápidos, para avaliar corretamente o potencial cancerígeno de um material qualquer, seja através da indução de câncer em animais de laboratórios ou através da indução de mutações em diferentes modelos experimentais. (SANTOS et al., 2006)

Para a avaliação da atividade mutagênica existem diversos ensaios, entre eles destaca-se o Teste de Ames, também conhecido como ensaio *Salmonella/microsoma*, que foi descrito em 1973 por Bruce Ames e revisado por Mortelmans e Zeiger (2000). É o ensaio mais utilizado atualmente para avaliação de mutagenicidade em amostras ambientais e validado em larga escala por diversos laboratórios. Além disso, tem sido muito empregado em estudos

para a elucidação de mecanismos de mutagênese, antimutagênese e na avaliação de efeitos sinérgicos de misturas de compostos. (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003)

Trata-se de um ensaio de mutação reversa que emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), apresentando diferentes mutações no *operon* deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a sua capacidade de síntese. O número de revertentes é medido pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo após a exposição de uma população de células à substância a ser testada. (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003)

O teste é sempre realizado na presença e na ausência de ativação metabólica exógena, realizada *in vitro* com homogeneizado de fígado de ratos. O uso da fração S9 revela se os compostos presentes na amostra necessitam ser metabolizados para se tomarem mutagênicos (mutágenos indiretos), se eles têm ação direta sobre o material genético em sua forma original ou, ainda, se são metabolizados por enzimas bacterianas endógenas (mutágenos diretos). (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003)

No presente trabalho, para avaliar a capacidade mutagênica do EHPr, utilizaram-se as linhagens de *Salmonella typhimurium*, TA98 e TA100, que têm se mostrado eficientes na detecção de grande número de mutágenos. (HOUK, 1992)

O estudo de mutagenicidade das plantas medicinais tradicionalmente utilizadas é válido em dois aspectos: primeiramente, como uma pesquisa de drogas com potencial quimioterápico e em segundo, como medida de segurança para o uso popular. (ELGORASHI et al., 2003; ARORA et al., 2005)

O EHPr, neste estudo, foi considerado mutagênico para a linhagem TA98 e apresentou indícios de mutagenicidade para as linhagens TA97a e TA102 nos ensaios sem ativação metabólica.

Essas diferentes linhagens apresentam mutações em etapas diversas da síntese da histidina. A mutação *hisD3052*, presente na TA98, ocorre na codificação do gene para histidinol desidrogenase. É uma mutação que afeta a leitura correta (-1C) de uma sequência próxima, constituída de oito resíduos GC-CGCGCGCG- repetitivos (*hot spot*). Essa mutação é revertida por agentes mutagênicos como 2-nitrofluoreno e derivado nitroaromáticos. (MORON; AMES, 1983)

A mutação *hisD6610*, presente na TA97, detecta substâncias que causam erro no quadro de leitura (+1C), sendo uma citosina adicional em sequência de seis citosinas no sítio de mutação. (LEVIN et al., 1982)

A linhagem TA102 contém a mutação *hisG428*, uma mutação *ochre*, TAA, que pode ser revertida por todas as seis possíveis modificações de pares de bases levando a transições e transversões. Essa mutação confere sensibilidade a agentes oxidativos. (LEVIN et al., 1982)

Embora o EHPr tenha apresentado mutagênico para uma das linhagens testadas, tal resultado pode ser avaliado em direção aos processos anticancerígenos, atuando de alguma forma como suporte no tratamento cancerígeno.

Diversos estudos foram realizados avaliando-se a citotoxicidade dos taninos e flavonóides, cujos resultados variam de um autor para outro. Os estudos realizados por Wall et al. (1988) demonstraram que flavonóides como quercetina, 3-metilquercetina e luteolina, apresentam ação mutagênica sem ativação metabólica, sendo que com ativação metabólica essa ação é ainda maior, e que a presença de hidroxilas livres no anel B e de uma hidroxila livre em C3 é essencial para essa atividade. Macgregor e Jurd (1978) já haviam demonstrado, através de um trabalho realizado com alguns flavonóides (quercetina, canferol, 3-metilquercetina e 7,4-dimetilquercetina), que a atividade mutagênica de flavonóides está relacionada à presença de grupos hidroxilas livres em C3 e C4 no anel B, de uma hidroxila livre em C3 e de uma dupla ligação entre C2 e C3.

Estudos realizados por Ferreira e Vargas (1999) com plantas utilizadas na medicina popular no sul do Brasil, indicaram que no ensaio com *S. typhimurium* os extratos de *Myrciaria tenella* Berg (Myrtaceae), *Smilax campestris* Griseb (Smilacaceae), *Tripodanthus acutifolius* Tiegh (Loranthaceae) e *Cassia corymbosa* Benth (Leguminosae), apresentaram atividade mutagênica, provavelmente devido à presença de flavonóides, taninos e antraquinonas nos extratos. Entre outras espécies de plantas que apresentam atividade mutagênica podem-se citar os estudos realizados por Santos et al. (2006) e Varanda (2006), que avaliaram a atividade genotóxica dos extratos das folhas e frações ricas em alcalóides e flavonóides em ensaios com *S. typhimurium* e micronúcleos. Os resultados mostraram que o extrato metanólico das folhas apresentou mutagenicidade positiva e foi capaz de induzir micronúcleos após o tratamento agudo. Para Santos et al. (2006), os componentes desse extrato induziram mutações gênicas e quebras no DNA.

Os flavonóides e taninos, classes de metabólitos secundários vegetais são reconhecidas tanto por propriedades benéficas quanto prejudiciais. (SANTOS et al., 2006)

Os taninos são descritos na literatura como compostos com atividades antimutagênica

(DAUER et al., 2003), antioxidante (HASLAM, 1996), antitumoral (SALEEM et al., 2002), dentre outras. Entretanto, esses polifenóis, da mesma forma que os flavonóides, apresentam potencial pró-oxidante (LABIENIEC; GABRYELAK; FALCIONI, 2003). De acordo com esses autores, os taninos, na presença de íons metálicos, deixam de ser antioxidantes e se tornam pró-oxidantes, citotóxicos e genotóxicos.

Para Santos (2006), a presença dos flavonóides e taninos pode explicar os resultados positivos de mutagenicidade obtidos nos estudos com as espécies *Miconia cabucu* e *Miconia rubiginosa*. Os taninos parecem de alguma forma colaborar com essa mutagenicidade, agindo como mutagênicos ou potencializando os efeitos dos flavonóides.

Outro mecanismo de toxicidade que pode envolver os taninos deve-se ao fato desses complexarem-se com facilidade a íons metálicos. Sistemas biológicos incluindo microrganismos necessitam de íons metálicos como cofatores enzimáticos. (SCALBERT, 1991)

Chung (1998) e Singh, Bhat e Sharma (2001) consideram os taninos nutricionalmente indesejáveis porque precipitam proteínas, inibem enzimas digestivas e afetam a utilização e vitaminas e minerais podendo, ainda, em alta concentração, desenvolver câncer de bochecha e esôfago.

Contraditoriamente, a atividade anticarcinogênica é evidenciada pelo mesmo autor Chung (1998) e outros colaboradores, onde afirmam que os japoneses consomem o chá verde em grandes quantidades diminuindo o risco de câncer gástrico, uma vez que o chá é rico em ácido tânico e outros polifenóis. Entretanto, ainda sugerem que os taninos possam ter duplo efeito: por um lado beneficiam a saúde contra a carcinogênese devido a seu efeito quimiopreventivo ou atividade antimicrobiana; por outro lado, estariam envolvidos na formação de cânceres, hepatotoxicidade ou efeitos antinutricionais.

Em contrapartida, em alguns estudos apresentados acima, algumas espécies de plantas, contendo entre outros componentes, taninos e flavonóides, são utilizadas popularmente no tratamento de tumores. Entre as espécies destacam-se o látex da *Euphorbia tirucalli*, que apresenta atividade farmacológica como antibacteriano (LIRIO; HERMANO; FONTANILLA, 1998), antiherpético (BETANCUR-GALVIS et al., 2002) e antimutagênico (REZENDE et al., 2004). Relata-se atividade co-carcinogênica (GSCWHENOT; HECKER, 1969) e anticarcinogênica (HECKER, 1968) e é utilizado na medicina popular como coadjuvante no tratamento de tumores cancerosos e pré cancerosos (LYMANN; ROBERT; ROBERTO, 1988). No nordeste do Brasil, o látex de *E. tirucalli* é usado popularmente em tumores de pele (CORRÊA, 1995; BETANCUR-GALVIS et al., 2002). As cascas do caule da

Schinus terebinthifolius Raddi, entre outros usos, são utilizadas empiricamente para tratar tumores. (ARAÚJO et al., 2007)

As atividades da *Senna occidentalis* como antioxidante, antitumoral, antimutagênica, imunoestimulante e protetora da imunossupressão também foram demonstradas por alguns autores. (YEN; CHEN; DUH, 1998; SHARMA et al., 1999; 2000; BIN-HAFEEZ; HAQUE; RAISUDDIN, 2001)

Fernandes (2002), ao avaliar a relação entre as substâncias que inibiam a expressão da enzima ciclooxigenase e a atividade citocida ou citostática em células tumorais, verificou que o extrato bruto da *P. reticulata* apresentava seletividade para algumas linhagens de células tumorais e inibia o crescimento de algumas delas, podendo estar relacionada à inibição da Cox-2. No mesmo estudo, o extrato bruto de acetato de etila da *P. reticulata* também apresentou atividade antiproliferativa apesar de não apresentar ação antiinflamatória.

Os resultados apresentados neste estudo quanto a ação mutagênica do EHPr e em conjunto aos demais estudos citados anteriormente agregam valor à espécie, incentivando, assim, estudos mais complexos voltados à busca de substâncias que atuem de alguma forma nos processos anticancerígenos, já que se apresenta capaz de induzir mutações no DNA de células, podendo contribuir nas etapas de tratamento de tumores. O diferencial para a preservação de uma determinada espécie vegetal pode estar no valor medicinal agregado.

7. CONCLUSÃO

Avaliando os resultados em conjunto apresentados neste estudo, conclui-se que todos os extratos de diferentes polaridades da *P. reticulata* foram capazes de impedir o bloqueio neuromuscular *in vitro* do veneno da *Bothrops jararacussu*, de modo dependente da concentração, sendo o EDM o que melhor representou essa proteção, seguido dos EHEX e EAET, que apresentaram uma proteção semelhante, e o EMET que apresentou um efeito menos eficaz em comparação aos demais extratos.

Esta ampla eficácia dos extratos revela-se promissora para futuro fracionamento em busca de elucidação estrutural, uma vez que o isolamento de substâncias puras é mais facilmente obtido de extratos apolares.

O EDM foi, ainda, capaz de reduzir a mionecrose causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu*.

O fato do extrato hidroalcoólico de *P. reticulata* ter se mostrado mutagênico para as linhagens de *Salmonella typhimurium*, TA98 e revelado indícios de mutagenicidade para cepas TA97a e TA100 pode ser atribuído à presença de taninos na planta. Sugere-se que mais estudos *in vitro* e *in vivo* sejam realizados para se verificar seu potencial antitumoral.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998.

AQUINO, F.G.; WALTER, B. M. T.; RIBEIRO, J.F. Especies vegetais de usos múltiplo e reservas legais de cerrado –Balsas MA; **Rev. Bras. Biociênc.**, v. 5, supl.1, p. 147-149, 2007.

ARAÚJO, A. A. **Medicina Rústica**. 3ª ed. São Paulo, Brasiliense, 1979.

ARAÚJO, E. C.; OLIVEIRA, R. A. G.; CORIOLANO, A. T.; ARAÚJO, E. C. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública de saúde em João Pessoa (PB). **Rev. Esp. Saúde**, Londrina, v. 8, p. 44-52, 2007.

ARORA S., BRITS E., KAUR K., SOHI R.S., KUMAR S., VERSCHAEVE L. Evaluation or genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. **J. Env. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v. 24, p. 193-200, 2005.

BALUMAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants. **Life Sci.**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BETANCUR-GALVIS, L. A.; MORALES, G. E.; FORERO, J. E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 541-546, 2002.

BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 75, p. 13-18, 2001.

BOCHNER, R. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 1999.
Disponível: <http://www.fns.gov.br/cenepi/publicacoes.htm>. Acesso em 13 de agosto de 2009.

BORBA, A. M.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 20, p. 771-782, 2006.

BORGES, R. C. **Serpentes peçonhentas brasileiras: manual de identificação, prevenção e procedimentos em caso de acidentes**. São Paulo: Atheneu, 1999.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Ações Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade do Cerrado e Pantanal. Brasília, DF, 1999.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, p. 112, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 6 ed., p. 816, 2008.

BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 1, p. 38-61, 1946.

CALIXTO, J. B. . Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnofarmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from brazilian savannas. **Brazilian Archives Of Biology And Technology, An Int. J.**, v. 47, p. 253-259, 2004.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JÚNIOR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 9, 1998.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M.G.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; LEITE, G. B.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Antibothropic Action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) Extracts. **Phytother. Res.**, v. 22, p. 784-790, 2008.

CORRÊA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. **Química Nova**, v. 18, 1995.

DAUER, A.; HENSEL, A.; LHOSTE, E.; KNASMÜLLER, S.; MERSCHSUNDERMANN, V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. In metabolically competent, human hepatoma cells (HEP G2) using single cell gel electrophoresis. **Phytochemistry**, v. 63, p. 199-207, 2003.

ELGORASHI E. E., TAYLOR J. L. S., MAES A., VAN STADEN, J., KIMPE, N.; VERSCHAEVE, L. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicol. Lett.**, v. 143, p. 195-207, 2003.

EMBRAPA. **Atlas do meio ambiente do Brasil. Brasília**. Ed. Terra Viva, 1994.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C.M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. São Carlos –SP: Editora da UFSC, 2. ed., p. 489, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. São Paulo, v. I, 1988.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA. 7ª ed. Lisboa, v. I e II, 2002.

FERNANDES, A. T. **Atividade farmacológica dos extratos obtidos de *Plathymenia reticulata* Benth (leguminose)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2002.

FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F.; PIMENTA, F. C. Atividade Antimicrobiana das Plantas. *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*; **Rev. Patol. Trop.**, v. 34, p. 113-122, 2005.

FERREIRA, M. E.; FERREIRA JR., L. G.; FERREIRA, N. C.; ROCHA, G. F.; NEMAYER, M. Desmatamentos no bioma Cerrado: uma análise temporal (2001-2005) com base nos dados MODIS-MOD13Q1. Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Florianópolis, Brasil, INPE, p.3877-3883, 21-26 abril 2007.

FERREIRA I.C. D. F., VARGAS V. M. F. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/ microsome assay. **Phytother. Res.**, v. 13, p. 397-400, 1999.

FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JÚNIOR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

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, V. (eds) **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1ª edição. Sarvier, São Paulo, p. 468, 2003.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. **Cad. Saúde Pública**, v. 11, p. 495-500, 1995.

GSCWHENOT, M.; HECKER, E. Tumor promoting compounds from *E. triangular*. **Tetrahedron Lett.**, v. 40, p. 3509-3512, 1969.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. **J. Chem. Ecol.**, v. 15, p. 1795-1810, 1989.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HECKER, E. Co-carcinogenic principles from seed oil of *Croton tiglium* and other Euphorbiaceae. **Cancer Res.**, v. 28, p. 2338-2349, 1968.

HERINGER, E. P.; FERREIRA, M. B. Árvores úteis no cerrado (I): Vinhático – o gênero *Plathymenia* Benth. *P. foliosa* Benth e *P. reticulata* Benth., vinhático da mata e vinhático do campo. **Cerrado**, v. 5, p.28-34, 1972.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTOS-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial

chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, p. 615-627, 1988.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Res.**, v. 277, p. 91-138, 1992.

JANUÁRIO, A. N.; SANTOS, A. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. L. R.; SATO, D. N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chem. Biol. Interact.**, v. 150, p. 243-251, 2004.

JIA, L. G.; SHIMOKAWA, K. I.; BJAMSON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**, v. 34, p. 1269-1276, 1996.

JORGE, M. T.; RIEBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 36, p. 66-77, 1990.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A.; SILVA, M. L.; KUSANO, E. J. U.; MENDONÇA, J. S. Bacteriology of abscesses complicating *Bothrops* snake bite in humans: a prospective study. **Toxicon**, v. 32, p. 743-748, 1994.

JORGE, M. T.; CARDOSO, J. L. C.; CASTRO, S. C. B.; RIBEIRO, L. A.; FRANÇA, F. O. S.; SBRÓGIO, M. E. A.; KAMIGUTI, A. S.; SANO-MARTINS, I. S.; SANTORO, M. L.; MONCAU, J. E. C.; WARRELL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G. A randomized blinded comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in São Paulo, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v. 89, p. 111-114, 1995.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conserv. Biol.**, v. 19, p. 707-713, 2005.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T.; FALCIONI, G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *unio tumidus*. **Mutation Res.**, v. 539, p. 19-28, 2003.

LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 343, p. 257-263, 1998.

LEVIN, D. E.; HOLLSTEIN, M. C.; CHRISTMAN, M. F.; SCHWIERS, E. A.; AMES, B. N. A new Salmonella test strain (TA102) with A:T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 79, p. 7445-7449, 1982.

LIRIO, L. G.; HERMANO, M. L.; FONTANILLA, M. Q. Antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines. **Pharma. Biol.**, v. 36, p. 357-359, 1998.

LOMONTE, B.; LEON, G.; HANSON, L.A., Similar effectiveness of Fab and F(ab')₂ antivenoms in the neutralization of hemorrhagic activity of *Vipera berus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 34, p. 1197-1202, 1996.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa. Ed. Plantarum, 1992.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa. Ed. Plantarum, 2002.

LYMANN, B.S.; ROBERT, J. D.; ROBERTO, M. K. **Flora ilustrada catarinense (Euforbiaceas)**. Santa Catarina. Ed. Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária S. A., 1988.

MACGREGOR, J. T.; JURD, L. Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. **Mutation Res.**, v. 54, p. 297-309, 1978.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. JR.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and cells by the comet assay. **Toxicol. In Vitro**, v. 18, p. 337-342, 2004.

MEDEIROS, J. D. A biotecnologia e a extinção das espécies. **Rev. Biotechnol. C Des.**, v. 30, p. 109-113, 2003.

MELO, R. F.; FARRAPO, N. M. ; ROCHA - JUNIOR, D.S. ; SILVA, M. G. ; COGO, J. C.; OSHIMA-FRANCO, Y. ; RODRIGUES-SIMIONI, L. ; GROPPPO, F. C. Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In: Raymond B. Keller. (Org.). Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources. New York: Nova Science Publishers, p. 249-262, 2009.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado, ambiente e flora**. Planaltina, EMBRAPA CPAC, p. 289-556, 1998.

MORON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v.113, p. 173-215, 1983.

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

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Res.**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MOSQUERA, A.; IDROVO, L. A.; TAFUR, A.; DEL- BRUTTO, O. H. Stroke following *Bothrops* spp. snakebite. **Neurology**, v. 60, p. 1577-1580, 2003.

MYERS, N.; MITTERMEYER, R.A.; MITTERMEYER, C. G.; FONSECA, G. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p.853-858, 2000.

NETO, G. G. O. Saber Tradicional Pantaneiro: As Plantas Medicinais E A Educação Ambiental. **Rev. eletrônica Mestr. Educ. Ambient.**, v. 17, p. 71-89, 2006.

OSHIMA, M.; LEITE, G. B.; ROSTELATO-FERREIRA, S.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Insights of the effects of polyethylene glycol 400 on mammalian and avian nerve terminals. **Muscle Nerve**, v. 41, p. 540-546, 2010.

Projeto jararaca. Disponível em:

<http://eco.ib.usp.br/labvert/Jararaca/imagens/jararacussu_foto2.htm> Acesso em: 21/04/07

Parque Natural da Madeira e plantas. Disponível em:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/56/Plathymenia_reticulata.jpg&imgrefurl=http://commons.wikimedia.org/wiki/ Acesso em: 01/05/2007

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R.; CORRÊA, J.B.C. Determinação espectrofotométrica de taninos pelo reativo fosfotungstico-fosfomolibdico. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 24, p.407-411, 1981.

REZENDE, J.R.; RODRIGUES, S. B.; JABOR, I. A. S.; PAMPHILE, J. A.; ROCHA, C. L. M. S. C. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 26, p. 481-484, 2004.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T.; IVERSSON, L. B. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas: estudo de casos atendidos em 1988. **Rev. Saude Publica**, v. 29, p. 380-388, 1995.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* série de 3139 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 475-480, 1997.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGES, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, v. 10, p. 475-489, 1983.

SALEEM, A.; HUSHEEM, M.; HARKONEN, P.; PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. Fruit. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 327-336, 2002.

SANTOS, F. V.; COLUS, I. M. S.; SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Assessment of the mutagenic potential of extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 1585-1589, 2006.

SCALBERT, E. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SHARMA, N.; TRIKHA, P.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Protective effect of *Cassia occidentalis* extract on chemical-induced chromosomal aberrations in mice. **Drug Chem. Toxicol.**, v. 22, p. 643-653, 1999.

SHARMA, N.; TRIKHA, P.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. *In vitro* inhibition of carcinogen-induced mutagenicity by *Cassia occidentalis* and *Embllica officinalis*. **Drug Chem. Toxicol.**, v. 23, p. 477-484, 2000.

SILVA JÚNIOR, M. C. Cem árvores do Cerrado: guia de campo. Rede de sementes do Cerrado. Brasília, 2005.

SILVA, M.R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, p. 5-19, 1999.

SINGH, B.; BHAT, T. K.; SHARMA, O. P.; **Livest. Prod. Sci.**, v. 68, 2001.

SOARES, A. M.; TICLI, F. K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M. V.; JANUÁRIO, A.H.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 2625-2641, 2005.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. São Carlos –SP: Editora da UFSC, 2. ed., p. 222, 2000.

TU, A. T. Venoms of crotalidae (Crotalids, pit vipers). In: **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, 1977.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. S. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) como indicador de mutagenicidade em potencial para mamíferos. In: RIOBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagênese Ambiental*. Editora da Ulbra, ISBN 85-7528-067-08, p. 12-81, 2003.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 27, p. 1-7, 2006.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; GAETANO, K.; MANIKUMAR, G.; TAYLOR, H.; MCGIVNEY, R. Plant antimutagenic agents, 4. Isolation and structure elucidation of maesol, an inactive constituent of *Maesa* spp. **J. Nat. Prod.**, v. 51, p. 1226-1231, 1988.

WARWICK, M. C.; LEWIS, G. P. Revision of *Plathymenia* (Leguminosae-Mimosoideae). **Edinb. J. Bot.**, v. 60, p. 111-119, 2003.

YEN, G. C.; CHEN, H. W.; DUH, P. D. Extraction and identification of an antioxidative component from jue ming zi (*Cassia tora* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 820-824, 1998.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. São Carlos –SP: Editora da UFSC, 2. ed., p. 489, 2000.

ANEXO A

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.ºA22/CEP/2008, sobre *“Estudo ampliado dos extratos da Plathymenia reticulata Benth contra os efeitos do veneno da Bothrops jararacussu”*, sob a responsabilidade de *Yoko Oshima Franco*, foi *aprovado* por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 15 de agosto de 2008.



PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade do Vale do Paraíba – Univap

