

PROPRIEDADE ANTIOFÍDICA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Mikania laevigata* SOBRE AS AÇÕES BIOLÓGICAS INDUZIDAS PELO VENENO DE *Philodryas olfersii* NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

Rita de Cássia de Oliveira Collaço*
Dimas dos Santos Rocha Junior**
Magali Glauzer Silva***
José Carlos Cogo****
Yoko Oshima-Franco*****
Priscila Randazzo-Moura*****

RESUMO: Embora negligenciadas pela maioria dos médicos, os acidentes com serpentes opistóglifas podem ser graves e até fatais. Envenenamentos por *Philodryas olfersii* demonstram efeitos local e sistêmico semelhantes aos envenenamentos por serpentes botrópicas. Para complementar a soroterapia, muitas plantas da medicina popular estão sendo estudadas por sua grande quantidade de compostos químicos e atividades farmacológicas, entre elas, *Mikania laevigata*, que demonstra ter os seguintes efeitos: antiinflamatório, antiedematogênico, antiulcerogênico, hipoglicêmico, antidiarréico, antimutagênico, antiasmático, broncodilatador, etc. Neste estudo, ensaios miográficos demonstraram que o extrato metanólico de *M. laevigata* (200 µL) inibiu 100% o bloqueio

* Graduada de Biologia, bolsista PIBIC-CNPq, Pontifícia Universidade Católica de Sorocaba. Rua Cláudio Manoel Costa, 57 Sorocaba, SP, Brasil. 18030-083 E-mail: cassia_collaco@hotmail.com

** Farmacêutico, bolsista TT3/FAPESP, Universidade de Sorocaba. Rodovia Raposo Tavares KM 92,5, Vila Artura, 18023-000, Sorocaba, SP, Brasil. E-mail: dsrjunior@gmail.com

*** Farmacêutica, Ms. em Fármacos e Medicamentos, Universidade de Sorocaba. Rodovia Raposo Tavares KM 92,5, Vila Artura, 18023-000, Sorocaba, SP, Brasil. E-mail: magali.silva@prof.uniso.br

**** Biólogo, Dr. em Farmacologia, Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, SP, Brasil E-mail: jccogo@univap.br

***** Farmacêutica, Dra. em Farmacologia, professora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade de Sorocaba. Rodovia Raposo Tavares KM 92,5, Vila Artura, 18023-000, Sorocaba, SP, Brasil. E-mail: yoko.franco@prof.uniso.br

***** Farmacêutica, Dra. em Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica de Sorocaba. Rua Cláudio Manoel Costa, 57 Sorocaba, SP, Brasil. 18030-083. E-mail: priscilarandazzo@yahoo.com.br

Recebido em: junho/2010 Avaliado em: julho / 2010

neuromuscular induzido pelo veneno bruto de *P. olfersii* (50 µg/mL). Conclui-se que o extrato metanólico da *M. laevigata* possui atividade antiofídica sob o parâmetro da junção neuromuscular.

PALAVRAS-CHAVE: *Mikania laevigata*. *Philodryas olfersii*. Junção neuromuscular.

ANTIOPHIDIAN PROPERTY OF *Mikania laevigata* METHANOLIC EXTRACT ON BIOLOGICAL ACTIONS INDUCED BY *Philodryas olfersii* VENOM IN MICE

ABSTRACT: Although accidents with opisthoglyphous snakes have been neglected by physicians they can be serious and even fatal. The *P. olfersii* bites show local and systemic effects similar to bothropic snake envenomation. In order to complement serum therapy, many folk medicine plants are being investigated for its large amount of chemical compounds and pharmacological activities, among them *Mikania laevigata*, which demonstrates the following antiinflammatory, antiedema, antiulcerogenic, hypoglycemic, antidiarrheal, antimutagenic, antiasthmatic, bronchodilator effects etc. In this study, *M. laevigata* methanol extract (200 µL) inhibited 100% of the action of *P. olfersii* crude venom (50 µg/mL), using myographical technique. We can conclude that the *M. laevigata* methanol extract has antiophidic activity under neuromuscular junction parameter.

KEY WORDS: *Mikania laevigata*. *Philodryas olfersii*. Neuromuscular junction.

INTRODUÇÃO

As serpentes *Philodryas* sp. pertencem à família Dipsadidae e possuem denticção opistóglifa, que lhes conferem a possibilidade de inocular veneno pelas suas presas (ZAHER *et al.*, 2009). Essa secreção é produzida pela glândula de Duvernoy, estrutura pouco estudada semelhante às glândulas produtoras de veneno dos viperídeos (CHING *et al.*, 2006). Serpentes deste gênero estão distribuídas em toda a América do Sul, desde a Amazônia até a Patagônia (PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1996) e é representada por aproximadamente 16 serpentes descritas e destas, 13 são encontradas no Brasil. (CARREIRO-DA-COSTA *et al.*, 2008)

Serpentes opistóglifas vinham sendo negligenciadas pela maioria dos médicos pela crença de que seu veneno fosse de pouca importância e ineficaz nos seres humanos (RODRÍGUEZ-ACOSTA *et al.*, 2006). Apesar dos acidentes com essas serpentes serem raros devido à sua denticção e ao seu comportamento pouco agressivo, algumas espécies podem provocar reações graves e até fatal (PEICHOTO *et al.*, 2004). *Philodryas olfersii*, *P. patagoniensis* e *P. viridis* são as espécies responsáveis pela maioria dos casos de envenenamentos por *Philodryas* no Brasil (CARREIRO-DA-COSTA *et al.*, 2008). Esses acidentes demonstraram efeitos local e sistêmico, podendo ser comparados com envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*, como: dor local, equimoses sem coagulação causando hemorragia, necrose tecidual, edema, eritema,

atividade fibrinolítica, linfadenopatia local, miotoxicidade e neurotoxicidade na junção neuromuscular e, em alguns casos, dor abdominal e vômitos (SILVA; BUONONATO, 1983-1984; ASSAKURA et al., 1992; PRADO-FRANCESCHI et al., 1996; PRADO-FRANCESCHI et al., 1998). Dentre as espécies de *Philodryas* descritas, a *P. olfersii* é a serpente cujo veneno tem sido mais amplamente estudado. (PEICHOTO et al., 2004)

Não existem evidências clínicas ou experimentais apoiando a utilização de soros anticrotálicos, mas os soros antibotrópicos são muito utilizados nos casos de envenenamento por serpentes do gênero *Philodryas*, pela atividade anti-hemorrágica desse soro. (ROCHA et al., 2006)

Durante a soroterapia, ocorre a neutralização dos efeitos tóxicos, mas geralmente, não ocorre a neutralização do dano tecidual. Muitos trabalhos buscam complementar a soroterapia, neutralizando principalmente os danos locais causados pelo envenenamento. Plantas utilizadas pela medicina popular vêm sendo muito estudadas para tratar envenenamentos por serpentes. Esses extratos de plantas constituem uma alternativa para o tratamento, apresentando uma grande quantidade de compostos químicos com diversas atividades farmacológicas de interesse médico-científico. (MAIORANO et al., 2005)

As atividades farmacológicas de algumas espécies do gênero *Mikania* (Asteraceae) têm sido estudadas. São encontradas nas regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul (no Brasil, principalmente no sul e sudeste) (CASTRO; JAKUPOVIC; BOHLMANN, 1986), 430 espécies foram identificadas, sendo 171 no Brasil (NUÑEZ et al., 2004). Estudos demonstraram que as espécies de *Mikania* sp. apresentam efeitos antiinflamatório, antiulcerogênico (BIGHETTI et al., 2005), hipoglicêmico (BARBOSA-FILHO et al., 2005), alelopáticos (DUARTE et al., 2004), antiasmático (GRAÇA et al., 2007), além de prevenir lesões pulmonares oxidativas (FREITAS et al., 2008), possuir atividade proliferativa linfocitária (OHKOSHI et al., 2004) e miorelaxamento uterino. (TIRAPELLI et al., 2004)

As espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* são conhecidas popularmente como “guaco” e suas folhas são utilizadas na medicina popular como xarope, extrato ou infusão (BIAVATTI et al., 2004) para o tratamento de diversas enfermidades do trato respiratório e, seu extrato é oficialmente registrado na Farmacopéia Brasileira I (BRANDÃO et al., 2006). Existe grande similaridade na composição química e morfologia entre as duas espécies e as principais diferenças são: a temporada de floração (que ocorre em julho para *M. glomerata* e em setembro para *M. laevigata*) e a distribuição geográfica (*M. glomerata* cresce no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai; já a *M. laevigata* cresce da costa litorânea de São Paulo ao Rio Grande do Sul). (PEDROSO et al., 2008; BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009)

Mikania laevigata foi pouco estudada fitoquimicamente, mas alguns componentes já foram isolados como, por exemplo, a cumarina, um dos seus principais com possíveis ações farmacológicas (FERREIRA, 2008). Maiorano et al. (2005) demonstraram que as atividades biológicas induzidas pelas enzimas presentes nos venenos ofídicos de *Crotalus* sp. e *Bothrops* sp. foram inibidas pelo extrato aquoso/seco de *M. glomerata*, provavelmente pela ação da cumarina, que inibiu os efeitos das fosfolipases, metaloproteínases e serinoproteínases presentes na composição desses venenos.

Até o momento, não se tem relatos na literatura sobre estudo da atividade antiofídica do extrato de *M. laevigata* contra as ações biológicas induzidas pelo veneno da serpente *P. olfersii*, o que justifica a originalidade dos objetivos propostos.

MATERIAL E MÉTODOS

O lote de veneno liofilizado de *P. olfersii* utilizado neste trabalho foi obtido de um “pool” da mesma espécie, certificado e doado pelo Prof. Dr. José Carlos Cogo (Serpentário do Centro de Estudos da Natureza - CEN-UNIVAP/SP) e o extrato metanólico de *M. laevigata* foi obtido pelo farmacêutico Dimas dos S. Rocha Junior, segundo os procedimentos preconizados (SIMÕES et al., 2004). Os ensaios farmacológicos foram realizados nos laboratórios da Universidade de Sorocaba.

Os camundongos foram anestesiados com halotano (via inalatória) e posteriormente exsanguinados. Após a dissecação para a retirada dos hemidiafragmas e isolamento dos nervos frênicos correspondentes (BÜLBRING, 1946), as preparações foram fixadas em cuba contendo 5 mL da solução nutritiva de Tyrode, com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e C₆H₁₂O₆ 11,1; aerada constantemente com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) e mantida a 37 °C. O músculo diafragma foi mantido por sua porção tendinosa sob tensão constante de 5 g. A preparação foi exposta à estimulação elétrica indireta (estimulador ESF-15D; 3 V; 0,1 Hz; 0,2 ms) e as contrações musculares foram registradas em um fisiógrafo 2-Channel Recorder Gemini contendo amplificadores Basic Preamplifiers (Ugo Basile), por meio de transdutor isométrico (Ugo Basile). Após um período de 20 min de estabilização, vários protocolos foram realizados: solução de Tyrode (controle), extrato metanólico de *M. laevigata* em diferentes concentrações (100, 200, 300 e 400 µL), *P. olfersii* (50 µg/mL) ou extrato metanólico (200 µL) por 30min seguido da adição de *P. olfersii* (50 µg/mL) por mais 90min, totalizando 120 min de incubação para todos os ensaios. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. A significância das diferenças observadas (valor p<0,05) foi determinada pelo teste não-pareado t-Student.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando a curva concentração-resposta do extrato metanólico de *M. laevigata* (Fig. 1), a concentração de 100 μL mostrou-se similar ao controle Tyrode, com alguns momentos de diferença significativa, devido discreta facilitação em torno de 60 a 70 min. Na concentração de 200 μL , notou-se uma ligeira diminuição da resposta contrátil nos primeiros 10 min com posterior recobro e facilitação progressiva até os 120 min, porém após a lavagem da preparação a amplitude se manteve próxima do valor controle. As concentrações maiores (300 e 400 μL) induziram bloqueio neuromuscular total e imediato de modo reversível ($p < 0,05$ comparado ao controle), como confirmado pelo registro contrátil pós-lavagem. Isso indica que *M. laevigata*, nas concentrações estudadas, não causou danos teciduais irreversíveis e que possivelmente o bloqueio neuromuscular ocorreu por saturação do meio nutritivo. Em alguns casos, a reversibilidade do bloqueio neuromuscular após a lavagem pode ser devido sua fraca afinidade aos receptores específicos na preparação, em detrimento à saturação do meio (NIRTHANAN et al., 2003).

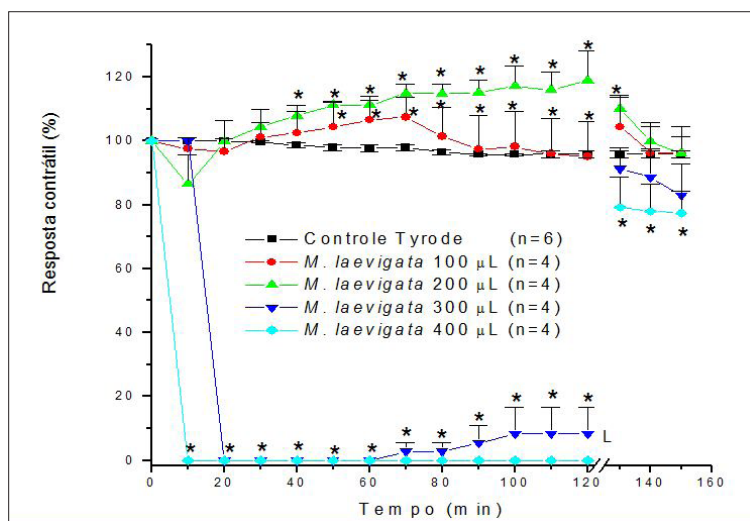


Fig. 1 Curva da resposta contrátil da preparação NFD, sob estimulação elétrica indireta, após adição de *Mikania laevigata*, a 37 °C, durante 120 min. Note que em baixas concentrações (100 e 200 μL) não houve bloqueio neuromuscular, mas ao contrário, promoveu uma facilitação reversível na resposta contrátil. Por outro lado, as altas concentrações (300 e 400 μL) promoveram bloqueio neuromuscular rápido e reversível com recobro da resposta contrátil após a lavagem da preparação. Os pontos representam a média \pm erro padrão da média dos experimentos (* $p < 0,05$ comparado ao controle Tyrode). L = lavagem. NFD, nervo frênico-diafragma.

Os experimentos com o veneno total de *P. olfersii* (50 µg/mL) apresentaram bloqueio neuromuscular progressivo e irreversível, confirmado pelo registro pós-lavagem, indicando possível dano tecidual (Fig. 2). Apesar concentração utilizada neste estudo ser elevada quando comparada às concentrações utilizadas de venenos botrópicos no mesmo modelo experimental, isto pode ser devido ao músculo diafragma ser pouco sensível a este veneno. Segundo Vanzolini, Ramos-Costa e Vitt (1980) a serpente *P. olfersii* tem hábito semi-arborícola ou terrestre, e embora sua alimentação inclua peixes, pequenos lagartos, anfíbios e roedores (ROCHA; MOLINA, 1987), tem um pequeno efeito nos mamíferos (roedores) quando comparado ao potente bloqueio neuromuscular em aves (PRADO-FRANCESCHI et al., 1996). Essa grande atividade nas aves parece ser característica das serpentes dessa família na América do Sul (FONTANA; HELENO; VITAL-BRAZIL, 1996; CARREIRO-DA-COSTA et al., 2008). Alguns venenos botrópicos também podem apresentar maior neurotoxicidade em preparações de aves do que em mamíferos. (HELUANY et al., 1992; ABREU et al., 2007)

A concentração de 200 µL de extrato metanólico de *M. laevigata* foi selecionada como ideal para verificar a atividade antiofídica, uma vez que foi a maior concentração do extrato que não causou redução da resposta contrátil, o que interferiria com os resultados, já que o veneno total induz bloqueio neuromuscular. O perfil miográfico nas preparações pré-tratadas se comportou semelhante às preparações pré-incubadas somente com extrato na concentração de 200 µL ($p > 0,05$), sugerindo que o efeito predominante foi a do próprio extrato, neutralizando o bloqueio neuromuscular característico do veneno (Fig. 2).

A atividade antiofídica de diversos extratos de plantas brasileiras tem sido testada contra venenos de serpentes viperídicas e elapídicas. Poucos trabalhos avaliam a atividade antiofídica de extratos de plantas contra venenos de serpentes opistóglifas, principalmente com as serpentes *Philodryas* sp.

A letalidade do veneno de *Crotalus* sp. foi significativamente inibido pelos extratos das plantas: *Tabernaemontana catharinensis* (BATINA et al., 2000), *Eclipta prostrata* (MORS et al., 1989), *Casearia sylvestris* (CAVALCANTE et al., 2007) e *Mikania glomerata* (MAIORANO et al., 2005). A letalidade do veneno de *Bothrops* sp. foi significativamente reduzida pelos extratos das plantas: *Casearia sylvestris* (BORGES et al., 2000), de *Brownea rosademonte*, *Tabebuia rosea*, *Pleopeltis percussa*, *Trichomanes elegans*, *Heliconia curtispatha*, *Bixa orellana*, *Tripartitum philodendron*, *Citrus limon* (OTERO et al., 2000). A letalidade do veneno de *Micrurus* sp. foi reduzida com os extratos das plantas: *Trichomanes elegans*, *Brownea rosademonte*, *Tabebuia rosea*, *Heliconia curtispatha* e *Bixa orellana*. (NUÑEZ et al., 2004)

O veneno de *Philodryas olfersii* possui metaloproteínases, porém é desprovido de enzimas de agregação plaquetária, trombina-like e fosfolipase A₂ (PRADO-FRANCESCHI et al., 1998). Apesar das plantas do gênero *M. glomerata* e *M. laevigata*

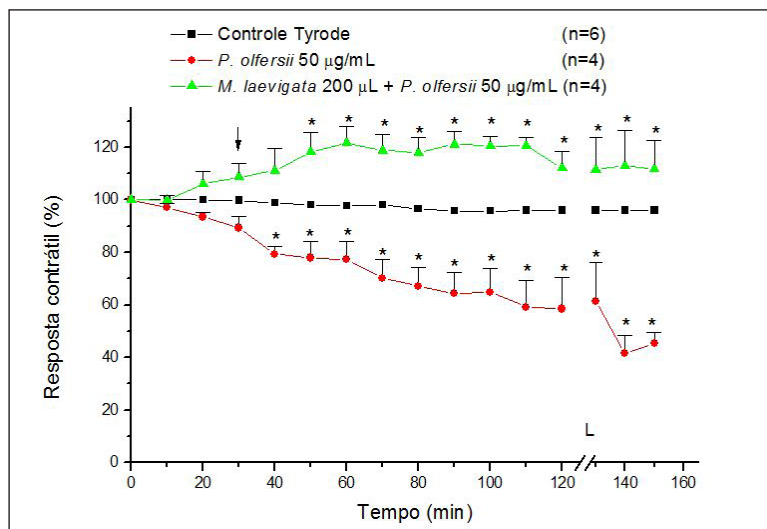


Fig. 2 Bloqueio neuromuscular de preparações NFD incubadas com solução de Tyrode, veneno de *P. olfersii* (50 µg/mL) ou pré-tratamento de *Mikania laevigata* (200 µL, 30 min) seguido de *P. olfersii* (50 µg/mL, 90 min), a 37 °C, durante 120 min. Note que o veneno total induziu parcial bloqueio neuromuscular na concentração estudada. Após a lavagem da preparação e suposta retirada do veneno não houve total recuperação da resposta contrátil, mostrando que as ações do veneno sobre a preparação biológica foram irreversíveis. Já as preparações previamente tratadas resultaram em 100% de proteção contra o veneno *P. olfersii*. Cada ponto representa a média ± erro padrão da média dos experimentos (* $p < 0,05$ comparado ao controle Tyrode). Setas: indica o momento de adição do veneno. L = lavagem. NFD, nervo frênico-diafragma.

possuírem basicamente os mesmos componentes químicos, acredita-se que a inibição da fosfolipase A_2 ocorre devido à contribuição da cumarina, principal constituinte do extrato. Um fato a ser observado é que Maiorano et al. (2005) e Floriano et al. (2009) comprovaram a atividade antiofídica de *M. glomerata* ao inibir a atividade fosfolipásica A_2 de veneno de serpentes viperídicas.

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, assim como do gênero *Philodryas* possuem metaloproteínases, responsáveis pelas hemorragias ao degradar a matriz extracelular, podendo ser citotóxica para as células endoteliais (OWNBY, 1990), mas somente *Bothrops* e *Crotalus* possuem fosfolipases A_2 que são responsáveis por causar hidrólise dos fosfolípidios da membrana, liberando componentes como o

fator ativador de plaquetas (BARBOSA, 2003). Castro et al. (1999) demonstraram que a *Mikania* sp não inibiu o efeito antihemorrágico do veneno de *Bothrops asper* devido o efeito anticoagulante da cumarina (VIELMA, 2008). Esses estudos demonstram que o extrato de *M. laevigata* não tem efeito antihemorrágico, sendo essa a principal atividade do veneno de *P. olfersii*, sugerindo que o extrato atuou em outra atividade biológica induzida pelo veneno bruto.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que o extrato metanólico da *M. laevigata* (guaco) possui atividade antifídica contra o veneno bruto de *P. olfersii*, sob o parâmetro da junção neuromuscular.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V. A. et al. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B.n.goyazensis*, *B.n. paranaensis* and *B.n.diporus*). **Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, United States, v. 148, p. 142-149, abr. 2007.
- ASSAKURA, M. T.; SALOMÃO, M. G.; PUORTO, G.; MANDELBAUM, F. R. Hemorrhagic, fibrinogenolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon**, England, v. 32, p. 819 - 831, abr. 1992.
- BARBOSA, Ana Maria. **Mecanismo de ação do edema induzido pelo veneno de serpente *Bothrops insularis* (jararaca ilhêa) em camundongos**. 2003. 46 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, São Paulo, 2003.
- BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 15, p. 392-413, out./dez. 2005.
- BATINA, M. F. et al. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. **Planta Medica**, Germany, v. 66, n. 5, p. 424-428, jun. 2000.
- BIAVATTI, M. W. et al. Coumarin content and physicochemical profile of *Mikania laevigata* extracts. **Zeitschrift für Naturforschung**, Germany, v. 59c, p. 197-200, mar./abr. 2004.
- BIGHETTI, A. E. et al. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, Germany, v. 12, p. 72-77, jan. 2005.

BOLINA, R. C.; GARCIA, E. F.; DUARTE, M. G. R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 19, n. 1b, p. 294-298, jan./mar. 2009.

BORGES, M. H. et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, England, v. 127, n. 1, p. 21-30, set. 2000.

BRANDÃO, M. das G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira Farmacognosia**, Brasil, v. 16, p. 408-420, jul./set. 2006.

BÜLBRING, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **British Journal of Pharmacology**, England, v. 1, p. 38-61, mar. 1946.

CARREIRO-DA-COSTA, R. S. et al. Neuromuscular action of venom from the South American colubrid snake *Philodryas patagoniensis*. **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, United States, v. 148, 148, p. 31-38, jul. 2008.

CASTRO, O.; GUTIERREZ, J. M.; BARRIOS, M.; CASTRO, I.; ROMERO, M.; UMAÑA, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. **Revista de Biología Tropical**, Costa Rica, v. 47, n. 3, p. 605-616, set. 1999.

