

**DARANA CAMURATI DA SILVA  
JULYANA FERNANDES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO DO  
EXTRATO da *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze em  
camundongos (*Mus musculus*) swiss**

**Guarulhos  
2008**

Camurati, Darana Silva & Fernandes, Julyana

Avaliação do potencial antiinflamatório do extrato da *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze em camundongos (*Mus musculus*) swiss / Darana Camurati da Silva & Julyana Fernandes – Guarulhos, 2008  
xi, 35p.

Trabalho de Conclusão de Curso, Curso de Ciências Biológicas – Universidade Guarulhos, 2008  
Orientador: Dra. Marta Ferreira Bastos  
Co-orientador: Biól. Denizar Missawa Camurça

1. *Marsypianthes chamaedrys*; 2. Inflamação ;  
**3. Antiedematoagênico.**

**DARANA CAMURATI DA SILVA  
JULYANA FERNANDES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO DO  
EXTRATO da *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze em  
camundongos (*Mus musculus*) swiss**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a  
Universidade Guarulhos como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas

**Orientadora: Dra. Marta Ferreira Bastos  
Co-orientador: Biól. Denizar Missawa  
Camurça**

**Guarulhos  
2008**

À uma pessoa que fez minha vida valer a pena  
e que sem o seu apoio tudo se tornaria mais difícil,  
minha amada avó Amara Inocência Silva, que precisou partir  
antes da conclusão deste trabalho.

À minha mãe Marcia Tereza (sobrenome) e minha avó Adélia(sobrenome)  
por ser a base de toda a minha vida e sabedoria

## AGRADECIMENTOS

Não há como fugir do bom e velho agradecimento se simplesmente esse sentimento está transbordando em nós.

Agradecemos este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível e não estaríamos aqui reunidos, desfrutando, juntos, destes momentos que nos são tão importantes.

Pessoas das nossas vidas... bem, à hora chegou e o gostinho de sentir que conseguimos é muito mais intenso ao olhar para trás e perceber o quão foi difícil, o quanto tivemos dúvidas, obstáculos, momentos de tristeza, alegrias infinitas e diversões aos montes. Não temos palavras suficientes para agradecer a vocês que nos apoiaram até agora e que nós tanto amamos nessa vida... Mães é impossível de expressar o tamanho da gratidão que sentimos por vocês pelo apoio incondicional em todos os momentos, esperamos poder retribuir este sentimento a altura e também esperamos que vocês tenham orgulho deste momento, essa conquista não é só nossa, uma parte significativa pertence à vocês, muito obrigada.

Agradecemos a nossa orientadora Prof. Dra. Marta Bastos pela sua grande influência em nossa formação, pelas dicas dadas na hora certa, por acreditar em nossa capacidade de produção, por nos confiar esse trabalho. Dedicamos esta nossa conquista com a mais profunda admiração e respeito.

À todos os professores que contribuíram decisivamente para a nossa formação acadêmica, profissional e pessoal. Ao Professor Franco Ferraro Calderaro pela leitura das lâminas, somos muito gratas á você. Ao Professor Sérgio Sato pelas aulas de estatísticas, na hora do seu lanche, você é muito especial. Ao Professor Carlos Firmo pelas autorizações para podermos ficar até mais tarde na faculdade, por nos ceder o GEA para as nossas práticas, nossa sem você ficaria mais difícil. A Professora Sheila pelos materiais cedidos durante a pesquisa. A Professora Nídia pelas correções do nosso trabalho. Ao Professor Adalberto José Monteiro Junior pela compreensão da dificuldade do último semestre, não pegando pesado com a turma. Ao Professor Mario Sérgio por ser um exemplo de conhecimento. A Professora Catarina Yamashita por nos aplicar provas ultra difíceis, mostrando que a ciência é assim mesmo, tem que estudar !!!!

Agradecemos especialmente ao nosso Co-orientador Denizar Missawa Camurça pela grande contribuição para nossa formação profissional no sentido de busca do conhecimento, bem como seus ensinamentos, conselhos e apoio durante essa jornada. Além de ser um excelente Co-orientador o Denizar foi um grande amigo, esteve ao nosso lado nesse longo e cansativo período que estivemos juntos. Uma das pessoas mais incríveis que conhecemos, fica o nosso muito obrigado de coração, você foi imprescindível ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Não queremos deixar também de mencionar o espírito colaborativo de muitos colegas de classe, com quem tivemos todo o prazer em trocar experiências e expressar opiniões diversas, e atualizar conhecimentos, passamos momentos juntos que jamais iremos nos esquecer.

Não poderíamos deixar de agradecer a todos que contribuíram direto ou indiretamente para a realização deste trabalho, são eles: Adriano Peres Ribeiro por ser a base de toda a minha determinação, pois sem você não teria concluído com sucesso; a Dulcinéia e Maurício pelo incentivo e compreensão; a minha irmã Dhafine, ao Bruno Soares, quanta paciência você teve; a Aline Gomes pelas palhaçadas, Angela Santos Duarte, Cristiane Mendes, Márcia Trindade, Simone Lima Ribeiro, (quantas horas de almoço estudando não é mesmo?); Fernando José Magueta pelo apoio; Marcelly Silva, Tatiana Érica (Japa), Lucas Munhoz, Everton Rodrigues, Daniela Araujo, Thais Narsizo, Valéria Zitei, Joel Megale.

Reiteramos aqui nossas palavras, sendo este um trabalho difícil, de que não se pode empreendê-lo sem a ajuda dos que nos cercam nos querem bem. A todos, o nosso muito obrigada.

*“Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.  
Porém, há os que lutam toda a vida.  
Esses são os imprescindíveis.”*

Bertolt Brecht

## RESUMO

*Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze, conhecida pelos nomes vernaculares: “Paracari”, “Bóia-caá”, “Erva de cobra” ou “Hortelã do Brasil”, pertence a família Lamiaceae e é utilizada popularmente no tratamento de acidentes ofídicos do gênero *Bothrops* e descrita na literatura por sua atividade analgésica, antifibrinolítica e moluscida. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do extrato da *M. chamaedrys* sobre a atividade edematogênica e as alterações leucocitárias sanguíneas induzidas por carragenina. Uma amostra das folhas do vegetal foi macerada em água destilada e, o sumo obtido foi liofilizado. A solução utilizada para avaliação do potencial antiinflamatório de *M. chamaedrys* foi obtida a partir da diluição da amostra liofilizada em solução salina, na concentração de 10mg/mL. Como indutor da inflamação aguda foi utilizada a carragenina (05 mg/mL) no modelo do coxim plantar em camundongos Swiss. O efeito da planta sobre atividade edematogênica e sobre as alterações leucocitárias foi avaliado nos períodos de 0, 1, 3, 6 e 8 horas. Para os grupos tratados e não tratados foi possível observar que a carragenina foi capaz de estimular a formação de edema e também promover alterações leucocitárias. Uma redução significativa do edema induzido pela carragenina ocorreu para os animais tratados com extrato de *M. chamaedrys*. Além disso, o extrato também foi capaz de modificar o padrão e o número de leucócitos sanguíneos induzido pela carragenina promovendo um aumento do número de linfócitos e diminuição de neutrófilos no período de 6 horas. Os resultados sugerem que o extrato de *M. chamaedrys* inibe a resposta inflamatória aguda induzida pela carragenina em camundongos.

Palavras-chave: *Marsypianthes chamaedrys*; inflamação; antiedematogênico.

## ABSTRACT

The *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze, known by the popular names: “Paracari”, “Bóia-caá”, “Erva de cobra” ou “Hortelã do Brasil”, belonging to family Lamiaceae and is used for the treatment of snakebite in the genus *Bothrops* and described in the literature on its analgesic activity, antifibrinolytics and molluscicide. The purpose of this study was to evaluate the effect of the extract of *M. chamaedrys* on the edematogenic activity and leukocyte changes induced by carrageenan. A sample of the leaves of the plant was macerated in distilled water and the juice obtained was lyophilized. The solution used for evaluating the antiinflammatory potential of *M. chamaedrys* was obtained from the dilution of sample in saline solution, the concentration of 10mg/mL. Carrageenan (5mg/ml) was used by induce a acute inflammatory response in the footpad model in Swiss mice. The effect of plant activity on edema and on changes of leukocyte number was evaluated in periods of 0, 1, 3, 6 and 8 hours. It was possible to observe that the carrageenan was able to stimulate the formation of edema and also promote changes leukocytes for treated and untreated groups. A significant reduction of edema induced by carrageenan occurred to the animals treated with extract of *M. chamaedrys*. Moreover, the extract was also able to modify the pattern and number of blood leukocytes induced by carrageenan promoting an increase in the number of lymphocytes and reduction of neutrophils in the period of 6 hours. The results suggest that the extract of *M. chamaedrys* inhibits the acute inflammatory response induced by carrageenan in mice.

Key-words: *Marsypianthes chamaedrys*; inflammation; antiedematogenic.

## SUMÁRIO

Agradecimentos	iii
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	2
3. Revisão Bibliográfica.....	3
3.1. Considerações sobre a <i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Valh) Kuntze...	3
3.2. Abordagem etnobotânica .....	6
3.2.1. Considerações sobre a etnomedicina de acidentes ofídicos....	8
3.3. Breve revisão sobre o sistema imunológico.....	10
3.3.1. Resposta inflamatória.....	13
3.3.2. A carragenina como indutor de inflamação aguda .....	14
4. Material e Métodos.....	15
4.1. Animais.....	15
4.2. Material vegetal.....	15
4.3. Preparo do extrato.....	15
4.4. Indução da resposta inflamatória aguda.....	16
4.5. Avaliação da atividade edematogênica.....	16
4.6. Avaliação das alterações leucocitárias	17
4.7. Análise histopatológica do infiltrado de células inflamatórias na região do coxim plantar induzido pela inoculação de carragenina e tratados com extrato de <i>M. chamaedrys</i> .....	18
4.8. Análise estatística.....	19
5. Resultados.....	20
5.1. Avaliação da atividade edematogênica.....	20
5.2. Contagem total de leucócitos.....	21
5.3. Contagem diferencial de leucócitos.....	22
5.3.1. Linfócitos.....	22
5.3.2. Polimorfonucleares.....	23

5.3.3. Monócitos.....	24
5.4. Análise histopatológica.....	25
6. Discussão.....	27
7. Conclusão.....	30
8. Referências bibliográficas.....	31
Anexo A .....	35

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 01: <i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Vahl) Kuntze.....	04
Fig. 02: Triterpenóides encontrados no extrato de <i>M. chamaedrys</i> . Adaptado de: (MENEZES, <i>et al.</i> 1999).....	05
Fig. 03: Extrato macerado de <i>M. chamaedrys</i> sendo preparado.....	16
Fig. 04: A – Inoculação de carragenina no coxim plantar da pata posterior dos camundongos. B – Extrato de <i>M. chamaedrys</i> administrado por via oral através de sonda de gavagem.....	17
Fig. 05: Análise intergrupos da variação na espessura da pata de camundongos inoculados com carragenina e tratados com o extrato de <i>M. chamaedrys</i> .....	21
Fig. 06: Análise intergrupos da contagem total de leucócitos. Diminuição significativa no período de 3h no grupo experimental em relação ao controle.....	22
Fig. 07: Análise intergrupos da contagem diferencial de linfócitos.....	23
Fig. 08: Análise intergrupos da contagem diferencial de polimorfonucleares.....	23
Fig. 09: Análise intergrupos da contagem diferencial de monócitos.....	24
Fig. 10: Análise histopatológica – A - 1h controle; B - 1h experimental; C- 3h controle; D- 3h experimental; E - 6h controle; F - 6h experimental; G - 8h controle; F - 8h experimental. Aumento 400X .....	26

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Análise do grupo inoculado com carragenina. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....	20
Tabela 2 – Análise do grupo experimental com o extrato macerado de <i>M. chamaedrys</i> . Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....	20
Tabela 3 – Escore histopatológico do coxim plantar dos camundongos do grupo controle (C) e experimental (E). 0 – Inexistente; 1 – Fraco; 2 – Moderado; 3 – Médio; 4 – Intenso; 5 – Muito intenso.....	25

## 1. INTRODUÇÃO

Muitas comunidades e grupos étnicos utilizam como único recurso terapêutico o tratamento com plantas medicinais. Tratar as enfermidades usando plantas é mais antigo do que a própria espécie humana. Em regiões mais pobres do Brasil e também em grandes cidades, as plantas medicinais são encontradas em residências e também são comercializadas em feiras livres. O conhecimento popular sobre plantas medicinais é de extrema importância na divulgação das propriedades terapêuticas, sendo assim pessoas que utilizam plantas medicinais de todo o mundo se mantêm na prática do consumo de fitoterápicos. Isso desperta o interesse de pesquisadores envolvendo diversas áreas de estudo como: fitoquímica, farmacologia e botânica, que se unem e aumentam o conhecimento sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (Maciel et al., 2002).

A *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze da família Lamiaceae é uma planta rasteira, aromática, que apresenta folhas simples, membranáceas, pecioladas, com flores violetas disposta em fascículos. É utilizada na medicina caseira contra mordedura de cobra, contra mordidas de mosquitos e pernilongos (Lorenzi; Matos, 2002). É descrita como aromática, antipirético, analgésica, antiespasmódica, carminativa (Lorenzi; Matos, 2002), moluscida (Menezes et al., 1999), antifibrinolítica (Castro et al., 2003).

Reconhecidamente, o estudo sobre o uso popular de plantas medicinais é uma ferramenta importante para a possível descoberta de novos fármacos. Este fato, associado ao número reduzido de publicações científicas com a *M. chamaedrys*, tornam bastante justificáveis estudos para avaliar o efeito desta planta sobre processos inflamatórios.

## 2. OBJETIVOS

- Avaliar a atividade anti-edematogênica do extrato macerado de *Marsypianthes chamaedrys* no modelo do coxim plantar de camundongos inoculados com carragenina;
- Avaliar a presença de infiltrado de células inflamatórias na região do coxim plantar por cortes histológicos;
- Avaliar as alterações leucocitárias induzidas pela carragenina e tratadas com o extrato macerado de *M. chamaedrys*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Considerações sobre a *Marsypianthes chamaedrys* (Valh) Kuntze

A Família Lamiaceae, também denominada Labiatae, foi descrita por Antonie Laurent de Jussieu. Destaca-se importante família devido ao grande número de plantas citadas como medicinais em todo o mundo. Outra característica importante dessa família é o fato de ter grande valor no mercado, por serem usadas como condimentos, alimentos, e na indústria de perfumes e cosméticos (Di-Stasi; Hiruma-Lima, 2002).

A *Marsypianthes chamaedrys*<sup>1</sup> (Vahl) Kuntze, é uma planta herbácea, anual, aromática, que apresenta ramos prostrados ou decumbentes, pubescente, muito ramificada, nativa do Continente Americano, apresentando altura de 30 a 60 centímetros e pode ser encontrada em todo o território brasileiro. Possui folhas simples, membranáceas, pecioladas, revestida por pubescência branco-translúcida, de 2 a 4 cm de comprimento. Flores de cor violeta, dispostas em fascículos longo-pedunculados axilares (Fig. 01). Multiplicando-se por sementes ou estacas (Lorenzi; Matos, 2002).

A *M. chamaedrys* é considerada uma planta daninha, empregada na medicina popular como, antipirética, antiespasmódica e carminativa, e utilizada na forma de banhos quentes contra reumatismo articular. O suco da planta é usado contra “mordedura” de cobra, contra picadas de mosquitos e pernilongos (Lorenzi; Matos, 2002), entretanto, existe um número bem reduzido de publicações científicas que comprovem a eficácia desta planta como antiinflamatório.

---

<sup>1</sup> *Clinopodium chamaedrys* Vahl; *Hypotis chamaedrys* (Vahl) Willd.; *Marsypianthes arenosa* Brandegees e *Marsypianthes hyptoides* Mart. ex Benth. São sinônimos de *M. chamaedrys* (Lorenzi; Matos, 2002)



Figura 01- *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze. Fotografia: Denizar Missawa Camurça, 2008

Análises fitoquímicas mostram que os tecidos da *M. chamaedrys*, são constituídos principalmente por triterpenos:  $\beta$ -amyrin,  $\alpha$ -amyrin, Germanicol, Lupeol, Castanopsol, Epigermanidiol, 2  $\alpha$ -hidroxy-lupeol e recentemente estudos farmacológicos conduzidos aqui no Brasil confirmaram um novo composto denominado chamaedridiol (Fig. 02) (Menezes et al., 1998). Além de terpenóides, foram encontrados esteróides em sua constituição química: sosterol e stigmasterol (Menezes, et al., 1999).

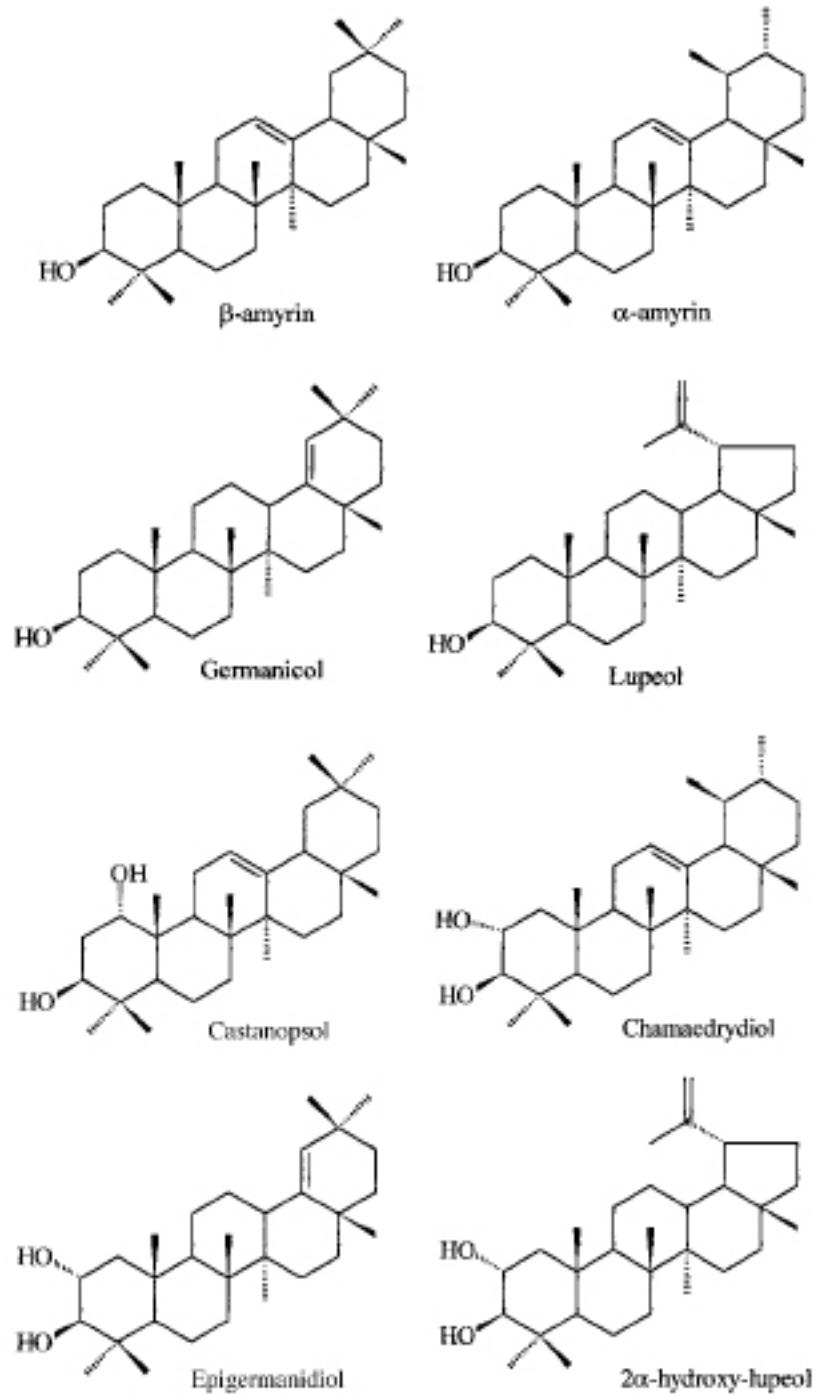


Figura 02- Triterpenóides encontrados no extrato de *M. chamaedrys*. Adaptado de: (Menezes, et al. 1999).

### 3.2. Abordagem Etnobotânica

Embora Hanshberger, em 1895, não tenha definido o termo etnobotânica, apontou maneiras pelas quais poderia ser útil a investigação científica de plantas utilizadas por determinadas populações ou grupos étnicos (Schultes, 1962). Desde então várias definições podem ser encontradas para a etnobotânica, dentre as mais recentes destacam-se:

- a) "disciplina que se ocupa do estudo e conceituações desenvolvidas por qualquer sociedade a respeito do mundo vegetal": engloba a maneira como um grupo social classifica as plantas e a utilidade que dá a elas (Posey apud Ribeiro, 1986).
- b) "verdadeira botânica científica voltada para o hábitat e uso de uma etnia específica": deve ser realizada por alguém treinado em botânica científica, que efetuará correspondências entre a classificação científica ocidental e local (Maciel et al., 2002).

A etnobotânica é citada na literatura como um dos caminhos alternativos que mais evoluiu nos últimos anos para a descoberta de produtos naturais bioativos. A descrição do histórico da planta como um recurso terapêutico eficaz para o tratamento e cura de doenças de determinado grupo étnico, se traduz na economia de tempo e dinheiro, dois dos fatores mais perseguidos pelas economias ocidentais. Esta área de pesquisa enfoca dois fatores fundamentais: coleta e utilização medicinal da planta (Maciel et al., 2002).

O primeiro fator implica na região, época e estágio de melhor desenvolvimento para a coleta. Envolve também, procedimentos especiais como preparação e depósito das exsicatas em herbário credenciado com a finalidade de evitar enganos com a espécie que está sendo estudada. Se a espécie vegetal medicinal estudada sofreu apenas investigação fitoquímica, deixando de lado a abordagem farmacológica, são válidos estudos que interliguem áreas multidisciplinares como etnobotânica, química e farmacologia, buscando resultados que possam validar ou não o uso da planta para fins medicinais. Em quaisquer circunstâncias, a pesquisa bibliográfica da planta alvo deve ser realizada

obedecendo-se os seguintes fatores: gênero, família e classes de substâncias predominantes (Maciel et al., 2002).

A planta escolhida deve ser seguramente identificada, a falta de identificação científica ou em caso de uma identificação errônea, todo o trabalho será anulado, tornando-o impublicável e praticamente inútil. Caso haja coleta em regiões diferentes, inicia-se novamente todo o processo de identificação botânica (Maciel et al., 2002), porque muitas vezes diferentes espécies com semelhanças morfológicas possuem o mesmo nome popular em lugares variados devido a grande diversidade cultural dos mateiros, decorrente principalmente da migração (Ehringhaus, 2003).

O segundo fator enfoca a investigação preliminar dos constituintes químicos de plantas que são: ácidos graxos; terpenóides; esteróides; fenóis; alcalóides; cumarinas e flavonóides que indica a natureza das substâncias presentes para facilitar a escolha da técnica de fracionamento cromatográfico, como: isolamento, purificação e caracterização específicos descritos previamente na literatura, se tornam essenciais para estas classes de substâncias (Maciel et al., 2002).

As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. No estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Os bioensaios podem envolver organismos inferiores, ensaios bioquímicos visando alvos moleculares e cultura de células animais ou humanas. O desenvolvimento de novas drogas bioativas necessita de modelos apropriados para a identificação de alvos moleculares que sejam fundamentais no crescimento celular seja *in vitro* ou *in vivo* (Maciel et al., 2002).

### 3.2.1. Considerações sobre a etnomedicina de acidentes ofídicos

Muitas plantas são utilizadas na medicina popular para tratar picadas de cobras. Em geral, a reputação de tais plantas é geralmente atribuída à superstição: "seria impossível enumerar e descrever em um único artigo, todas as fantásticas terapias baseadas em feitiçaria, boatos e lendas". Por conseqüência, algumas tentativas foram feitas para investigar cientificamente estas afirmações por meio de experimentos totalmente controlados. Empresas em todo o mundo já estão interessadas em plantas que têm sido usadas anteriormente na medicina popular, tais substâncias têm sido isoladas e introduzidas como medicamento para o tratamento de diversas doenças. Sendo assim, é necessário demonstrar as limitações de tais substâncias, de modo a evitar um tratamento inadequado com qualquer tipo de planta (Martz, 1992).

Muitas pessoas que vivem em zonas rurais e comunidades isoladas, são totalmente expostas a acidentes com picadas de cobras. Infelizmente, os recursos médicos são limitados em tais casas rurais e os doentes não podem contar com um atendimento rápido. Como conseqüência, 60% das vítimas são tratadas por curandeiros tradicionais, embora as plantas são conhecidas por dar origem a vários fármacos utilizados na medicina moderna. A eficácia dos tratamentos tradicionais deve ser rigorosamente avaliada em um modelo experimental bem elaborado (Otero et al., 2000 a).

Serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% de acidentes ofídicos na América Latina. O seu veneno induz efeitos locais e sistêmicos, tais como inchaço, hemorragia, desordens hemostáticas e nefrotoxicidade. Durante muitos séculos, curandeiros tradicionais ao longo de todo o mundo têm utilizado medicamentos naturais para tratamento de picadas de cobras, sendo indicado para aliviar principalmente os sintomas de inchaço e hemorragia (Otero et al., 2000 b).

Diferentes espécies de plantas são utilizadas pelos curandeiros contra picadas de cobras, e estão sendo avaliadas quanto à sua capacidade neutralizante, contra os efeitos letais e enzimáticos de veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, principal gênero de serpente de importância epidemiológica (Otero et al., 2000 a). A partir dos curandeiros, estudos são feitos com vários tipos de extratos de plantas contra picadas de serpentes do gênero *Bothrops*. Assim, os extratos são

administrados quer seja oralmente ou por aplicação externa sobre a ferida, ou ambos (Otero et al., 2000b).

Há muito tempo atrás os pesquisadores já desenvolviam estudos para combater distúrbios hematológicos causados por envenenamentos provocados por animais peçonhentos (Barraviera, 1999). Foram realizados estudos *in vitro* para verificar os diferentes venenos ofídicos, e foi demonstrado que acidentes envolvendo os gêneros *Bothrops* e *Crotalus* causavam hemólise quando em contato com hemácias de diversos animais, inclusive a do homem (Kellen et al., 1962). Experimentos *in vivo* com ratos da linhagem Wistar inoculados com venenos de serpentes do gênero *Crotalus*, demonstraram a ocorrência de leucopenia 30 minutos após a inoculação do veneno, seguida de intensa leucocitose com neutrofilia. Segundo os autores (Costa et al., 1989), a leucopenia observada inicialmente deve ter ocorrido devido ao efeito do veneno, e a leucocitose que se deu após 30 minutos por reação do próprio organismo do animal (Barraviera, 1999).

Baseado nessas observações e na literatura imunológica, o veneno dos animais peçonhentos atuam no organismo humano de maneira semelhante a um trauma agudo. Nessa situação as células alvo dos indivíduos acidentados (macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e linfócitos) liberariam citocinas, em especial a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), que atuariam na medula óssea ativando a produção e liberação de neutrófilos e células jovens como bastonetes e metamielócitos. Atuariam ainda no hipotálamo mediando a febre, além de estimular a liberação do hormônio adenocorticotropina (ACTH), que tem função de estimular a glândula suprarenal, bem como a produção de glicocorticóides, que quando em excesso na circulação irá deprimir a resposta imune celular, causando linfopenia e aneosinofilia, além de diminuir a resposta inflamatória (Oppenheim et al., 1991).

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* atua na atividade coagulante do sangue por meio de diversos mecanismos; entre eles podemos citar a ação direta no fibrinogênio ativando o fator X, protrombina, e plaquetas. Acredita-se que esta fração é capaz de converter o fibrinogênio diretamente em fibrina, levando o doente a uma afibrinogenemia, culminando com o prolongamento do tempo de coagulação (Barraviera, 1999).

### 3.3. Breve revisão sobre o sistema imunológico

O sistema imunológico é constituído por duas linhas de defesa, a primeira é denominada resposta imune inata que atua de forma mais simples impedindo que os agentes patogênicos tenham acesso ao organismo do hospedeiro (Barraviera, 1999). Várias células constituem essa imunidade dentre elas encontram-se os monócitos sanguíneos, que quando se apresentam nos tecidos passam a ser chamado de macrófagos. A principal função do macrófago é fagocitar e efetuar o combate às bactérias, vírus e protozoários (Silva; Mota, 2003).

Devido às células apresentarem grânulos citoplasmáticos constituídos por componentes com carga elétrica negativa ou positiva, as mesmas acabam por interagir com corantes ácidos ou básicos. Os basófilos recebem este nome pois interagem com corantes básicos, acidófilos quando interagem com corantes ácidos e os componentes que apresentam ambas as cargas são denominados neutrófilos (Silva; Mota, 2003).

Eosinófilos apresentam granulações citoplasmáticas compostas pelas proteínas tais como: Proteína Básica Principal (MBP), Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP), Neutroxina Derivada de Eosinófilo (EDN). Saem da medula óssea e chegam à corrente sanguínea onde permanecem por 13 horas, depois migram para o tecido e permanecem por mais tempo que o neutrófilo, exercendo sua função na defesa contra infecção, liberando seus grânulos sobre parasitas como helmintos (Silva; Mota, 2003).

Basófilos apresentam grânulos com histamina, várias enzimas (histidina descarboxilase, diaforase) e heparina. São encontrados em menor número e permanecem na circulação por aproximadamente duas semanas (Silva; Mota, 2003).

Os polimorfonucleares neutrófilos constituem o leucócito predominante na corrente sanguínea, apresentando tempo de vida curto. Apresenta o núcleo multilobulado e com vários grânulos citoplasmáticos e são muito importantes na resposta inflamatória. Também são polimorfonucleares os eosinófilos que apresentam funções similares aos neutrófilos, sendo mais efetivos na destruição de parasitas e encontrados em um número elevado em sítios de reações alérgicas. Os basófilos também estão envolvidos em processos alérgicos, trata-se de uma célula grande que apresenta grânulos de histamina. Quando estão presentes no tecido se

diferenciam em mastócitos que tem importante participação nas reações alérgicas e proteção das mucosas contra parasitas (Roitt; Delves, 2004).

A pele apresenta uma barreira mecânica de grande eficácia contra os agentes patogênicos, uma vez que intacta é impermeável à maioria dos agentes infecciosos (Barraviera, 1999), quando ocorre a perda da pele a infecção torna-se um grande problema. Além disso, a maioria das bactérias não consegue permanecer por muito tempo na pele, devido aos efeitos inibitórios como ácido láctico e dos ácidos graxos presentes no suor e nas secreções sebáceas e o baixo pH que esses ácidos produzem (Roitt; Delves, 2004). Quando esses mecanismos não são suficientes para evitar a doença, ocorre ativação da segunda linha de defesa, a imunidade adquirida ou adaptativa (Barraviera, 1999).

Se um antígeno vence esses primeiros sistemas de proteção e penetra nos tecidos, ocorre um processo de mobilização de diferentes tipos celulares associados a fenômenos vasculares, caracterizando uma reação inflamatória, na qual ocorre mudança nos calibre e no fluxo sanguíneo nos vasos locais, o que permite o processo de chegada de fatores solúveis e células fagocitárias representadas principalmente por polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos aos tecidos próximos do foco da infecção. São atraídos para o foco infeccioso pelo processo de quimiotaxia realizado pelos fatores derivados da ativação do sistema complemento. As principais funções do sistema do complemento é promover a fagocitose de microrganismos, estimular a inflamação por fragmentos proteolíticos de proteínas denominadas anafilatoxinas (C3a, C4a e C5a), induzir a lise desses microrganismos, a opsonização de complexos imunes (Abbas; Litchman, 2005).

O organismo desenvolveu o sistema complemento para combater os microrganismos que cada vez mais sofrem mutações e sempre produzem novas espécies capazes de sobrepujar nossas defesas (Roitt; Delves, 2004). O sistema do complemento e os fagócitos são componentes da imunidade inata que se apresentam inativos, mas sempre prontos para responder rapidamente a presença de microrganismos. As principais proteínas circulantes estão presentes no complemento e proteínas plasmáticas capazes de reconhecer estruturas microbianas, como a lectina de ligação de manose. A ativação do sistema do complemento envolve a proteólise para gerar enzimas com atividades proteolíticas, formando assim uma cascata proteolítica. Os produtos dessa ativação tornam-se

ligados covalentemente á superfície das células microbianas ou a anticorpos ligados a microrganismos e a outros antígenos (Abbas; Litchman, 2005).

A ativação do sistema complemento pode ser através de 3 vias:

**Via Clássica** é um mecanismo da imunidade humoral, a qual é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo, que podem ser solúveis, fixos na superfície das células ou matrizes extracelulares. Essa via é iniciada pela ligação de C1 aos imunocomplexos, resultando na produção das convertases C3 e C5 ligadas a superfície a qual o anticorpo se encontra depositado, a convertase C5 cliva C5 para iniciar as etapas tardias da ativação do complemento (Abbas; Litchman, 2005).

**Via Alternativa** é ativada na superfície microbiana na ausência de anticorpo, resultando na proteólise C3, onde o C3b liga-se á proteína plasmática denominada Fator B, que após se ligar é clivado por uma protease serina plasmática denominada Fator D, que irá gerar um fragmento Bb, formando assim um complexo C3bBb denominado C3- convertase da via alternativa que tem como função amplificar a ativação do complemento. A molécula C3b gerada pela C3-convertase se ligam entre si resultando na formação de um complexo C3bBb3b a qual funciona como C5-convertase da via alternativa iniciando as etapas tardias da ativação (Abbas; Litchman, 2005).

**Via da Lectina** é ativada na ausência de anticorpo por uma lectina plasmática que se liga à resíduos de manose nos microrganismos, devido se ligar a resíduos de manose apresenta uma estrutura similar a C1 ativando o complemento pelo complexo enzimático C1q ou por associação a uma esterase serina associada á proteína de ligação a manose, a qual cliva C4 e segue as demais etapas igual a via clássica. Embora as vias de ativação do complemento difiram na forma como são ativadas, todas elas resultam na geração de complexos enzimáticos que são capazes de clivar a proteína mais abundante do complemento, o C3. Os mecanismos efetores da imunidade inata é a via alternativa e a via da lectina, em que a ativação consiste em etapas iniciais e tardias, onde a etapa inicial gera dois produtos proteolíticos do C3 denominados C3a produto menor e C3b produto maior que vai se mantém ligado na superfície da célula microbiana e as moléculas de anticorpo, ligando-se a outras proteínas do complemento assim iniciando as etapas tardias (Abbas; Litchman, 2005).

A continuidade da cascata do sistema complemento na etapa tardia dá origem ao C5 que é ativado produzindo C5a e C5b que atuam na membrana da célula

tornando-a permeável ao soluto e vão produzir a lise osmótica (Roitt e Delves, 2004). Os demais componentes da cascata C6, C7, C8 e C9 são proteínas sem atividades enzimáticas. O C6 e C7 se ligam ao complexo C5b formando C5b67 que se insere dentro da bicamada lipídica da membrana plasmática. O C8 também se liga ao complexo formando C5b678 que tem capacidade de lisar as células. O C9 ao se ligar na cascata forma o MAC (complexo de ataque a membrana) o qual cria poros na membrana permitindo o livre movimento de água e íons, onde a água resulta em edema osmótico e rupturas das células, cuja superfície o Mac está depositado. O cálcio que se apresenta em alta concentração fora da célula, também entra e pode induzir apoptose em células nucleadas. Os poros formados são similares aos poros formados pela perforina proteína encontrada em linfócito T e células NK (Abbas; Lichtman, 2005).

O C5a também é um potente agente quimiotático para os neutrófilos, atraindo as células do sistema imune para o local onde o sistema complemento foi liberado, aumentando assim a permeabilidade capilar. O C3a e o C5a atuam sobre os mastócitos induzindo a liberação de mediadores como histamina, leucotrieno B<sub>4</sub>, com efeito sobre a permeabilidade capilar, a adesão leucocitária e a quimiotaxia dos neutrófilos ativando-os (Roitt; Delves, 2004).

### **3.3.1. Resposta inflamatória**

Aulus Cornelius Celsus que viveu aproximadamente de 30 a 50 anos a.C. foi o primeiro a descrever o processo inflamatório. Mais tarde com o auxílio do microscópio R. Virchow descreveu as reações celulares e o E. Metchnikoff descreveu a fagocitose. A inflamação é um processo contínuo e pode ser dividido em fases: degenerativa, vascular e regenerativa. Nota-se que o 1º estágio da inflamação que ocorre nos primeiros minutos (1,0 - 1,5 min) aparece no local, uma área central de cor vermelha escura, revestida mais externamente por uma faixa estreita de cor vermelha mais clara. No 2º estágio que acontece entre 3,0 a 3,5 minutos após a entrada do antígeno, observa-se que a área central torna-se mais nítida devido ao aumento de volume ocasionado pelo edema que se instala. No 3º estágio que ocorre de 40 a 50 minutos após a entrada do antígeno, pode ser visualizada uma progressão do edema que empalidece e tem seus limites mais elevados e menos nítidos, apresenta rubor, calor e tumor (Silva; Mota, 2003).

Neutrófilos após entrarem na circulação sanguínea circulam por aproximadamente 6 a 10 horas, depois se deslocam para a margem do fluxo aderindo ao endotélio, em alguns tecidos duram de 1 a 2 dias e morrem, já nos alvéolos pulmonares permanecem por pouco tempo e depois são expelidos para o exterior. Os neutrófilos que migram para o foco da infecção se movimentam através de pseudópodes contra o gradiente de substâncias quimiotáticas. Após serem atraídos para o foco da infecção, fagocitam e depois degranulam liberando substâncias ativas que servem para desintegrar o patógeno e digerir o antígeno (Silva; Mota, 2003).

### **3.3.2. A carragenina como indutor de inflamação aguda**

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado de alto peso molecular derivado de várias espécies de algas vermelhas da família *Rhodophyceae* (Buck et al., 2006). Tem sido utilizada como emulsificante pelas indústrias alimentícias (Roch-Arveiller; Giroud, 1979). Curiosamente, esta substância também é usada como lubrificantes sexuais e preservativos lubrificados (Buck et al., 2006).

Em diversos estudos, tem sido escolhida como substância ideal para avaliação do efeito antiinflamatório de diversas substâncias como secreções animais e plantas, devido a sua capacidade de induzir inflamação local aguda (Roch-Arveiller; Giroud, 1979).

O edema provocado pela carragenina ocorre em três fases. Na primeira hora após a injeção de carragenina acontece o aumento da permeabilidade vascular mediado pela liberação de histamina e serotonina. Na segunda hora, o aumento da permeabilidade é mediado pela liberação de cininas. A fase de maior intensidade do edema ocorre três horas após a injeção de carragenina e é caracterizada pela ação de prostaglandinas sobre a permeabilidade capilar (Lemos, 2007).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*, Swiss, machos, com idade 60 dias e peso variando entre 33,34 a 39,15 g. Os animais foram criados e mantidos no Biotério Central do Laboratório de Biociências da Universidade Guarulhos, com ração (Labina Purina) e água *ad libidum*, em períodos alternados de luz e escuridão.

### **4.2. Material vegetal**

A espécie *Marsypianthes chamaedrys* foi coletada na região do Cabuçu, município de Guarulhos – SP (23° 23' 30" W, 46° 32' 45" S). A coleta foi feita em março de 2008 no período da manhã e o material vegetal foi levado imediatamente para a Universidade Guarulhos. A identificação do material foi feita pelo Professor Moacir Biondo da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e comparada com uma exsicata depositada no Missouri Botanical Garden (Anexo A).

### **4.3. Preparo do extrato**

Imediatamente após a coleta, o material vegetal (69,9g) contendo folhas e flores foi macerado (Fig. 03), espremido, filtrado em papel filtro e o sumo liofilizado, obtendo-se o extrato macerado (2,718g)

A solução estoque utilizada no experimento foi feita diluindo 100mg do extrato liofilizado em 10 mL de solução salina.



Figura 03 – Extrato macerado de *M. chamaedrys* sendo preparado. Fotografia: Denizar Missawa Camurça, 2008

#### 4.4. Indução da resposta inflamatória aguda

Para a indução da resposta inflamatória aguda foi utilizada a carragenina (Sigma) diluída em solução fisiológica na concentração de 5 mg/mL. A substância foi inoculada no volume de 0,05 mL por via subcutânea na região do coxim plantar da pata posterior esquerda do camundongo.

#### 4.5. Avaliação da atividade edematogênica

Para a realização dos experimentos foram constituídos dois grupos (n=5). No grupo controle, foi inoculado pela via subcutânea 0,05 mL de uma solução contendo carragenina em uma concentração de 5mg/mL no coxim plantar da pata posterior esquerda dos animais. A pata posterior direita foi utilizada como controle, inoculando o mesmo volume de solução fisiológica. O outro grupo, denominado experimental, foi inoculado pela via subcutânea 0,05 mL de solução contendo carragenina (5mg/mL)

no coxim plantar da pata posterior esquerda de cada animal, e a pata contralateral inoculada com o mesmo volume de solução fisiológica (Fig. 04-A). Após 40 minutos foi administrado por via oral através de sonda de gavagem 0,5 mL do extrato de *M. chamaedrys* diluído em solução fisiológica (Fig. 04- B).

As medidas para determinar a alteração na espessura das patas foram feitas na região do coxim plantar nos períodos de 0, 1, 3, 6 e 8 horas após a inoculação de ambos os grupos, com o auxílio de um paquímetro (Manostat, modelo 6911). Os resultados de avaliação do edema foram expressos em milímetros.

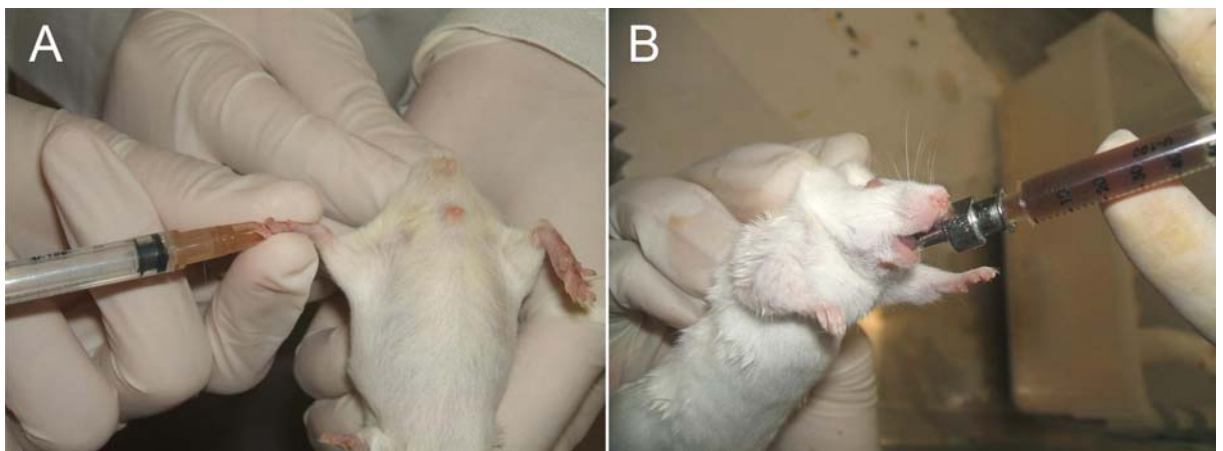


Figura 04: A – Inoculação de carragenina no coxim plantar da pata posterior dos camundongos. B – Extrato de *M. chamaedrys* administrado por via oral através de sonda de gavagem. Fotografia: Denizar Missawa Camurça, 2008

#### 4.6. Avaliação das alterações leucocitárias

Para avaliação das alterações leucocitárias totais induzidas pela carragenina em conjunto com o extrato macerado de *M. chamaedrys*, os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital com auxílio de uma pipeta Pasteur, nos períodos de: 0, 1, 3, 6 e 8 horas após a inoculação da carragenina.

Uma amostra de sangue foi imediatamente colocada em um tubo contendo EDTA, como anticoagulante, e em seguida homogeneizada. Uma alíquota do sangue coletado foi diluída em Líquido de Turk (1:10) e colocada em hematocítmetro (câmara de Neubauer) para contagem total de leucócitos. Os resultados foram expressos em número de células por mililitro de sangue.

Para a contagem diferencial de leucócitos, foi confeccionado o esfregaço sanguíneo de cada amostra e após a secagem, os mesmos foram submetidos ao

processo de coloração utilizando o kit Instant-Prov (Newprov) composto por Ciclohexadienos a 0,1%, Azobenzenosulfônicos a 0,1% e Fenotiazinas a 0,1%. O procedimento de coloração, reagentes utilizados e períodos de incubação foram realizados conforme recomendação do fabricante. A análise foi feita com auxílio de um microscópio óptico (Nikon modelo YS2) com aumento final de 400X e a contagem diferencial foi feita para determinação da proporção de monócitos, linfócitos e polimorfonucleares para o grupo controle e para o grupo experimental, por meio da contagem de 100 células/lâmina. Os resultados foram expressos em porcentagem.

#### **4.7. Análise histopatológica do infiltrado de células inflamatórias na região do coxim plantar induzido pela inoculação de carragenina e tratados com extrato de *M. chamaedrys*.**

Os animais foram pesados, separados em grupos (n=3) e inoculados pela via subcutânea na região do coxim plantar da pata posterior esquerda com 0,05 mL de uma solução de carragenina (5mg/mL) a pata contralateral foi utilizada como controle, inoculando o mesmo volume de solução fisiológica. Um volume de 0,05 mL do extrato de *M. chamaedrys* na concentração de 10mg/mL, foi administrado em dose única por via oral através de sonda de gavagem (Fig. 04-B) após 40 minutos da inoculação da carragenina. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical nos períodos 0, 1, 3, 6 e 8 horas após a inoculação, e tiveram suas patas posteriores esquerdas removidas, separadas e fixadas em solução de formol 10% durante 24 horas.

A região correspondente ao coxim plantar foi extraída e submetida a processo de desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina. As lâminas foram confeccionadas no Departamento de Anatomia e Patologia do Hospital das Clínicas, através da Técnica Histológica de rotina (H/E).

A análise histológica das lâminas foi efetuada pelo Prof. Dr. Franco Ferraro Calderaro responsável pelo setor de anatomia patológica do Hospital Veterinário da UnG (Universidade Guarulhos).

#### **4.8. Análise estatística**

Para análise das alterações na espessura da pata e das alterações hematológicas dentro do mesmo grupo foi, inicialmente, utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), e as comparações múltiplas dos grupos foram realizadas por meio de teste de Turkey-Kramer. As análises comparativas entre os dois grupos foram feitas pelo teste “*t*” de Student não pareado, sendo o nível de significância estabelecido para  $p < 0,05$ . As análises foram efetuadas pelo programa Graph Pad InStat e as figuras dos resultados foram feitas com a utilização do programa Microsoft Excell.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação da atividade edematogênica

Inicialmente foi feita uma avaliação para os mesmos animais (intra-grupo) entre os diferentes períodos a fim de constatar se a carragenina foi capaz de induzir uma resposta inflamatória aguda. Para a pata direita, na qual foi inoculado somente solução salina, não foi detectado um aumento na espessura da pata para o grupo controle e nem para o grupo experimental (Tabela 2). Conforme pode ser observado na tabela 1, a carragenina foi capaz de causar um aumento na espessura da pata dos animais após 1 hora e os valores retornaram ao normal após o período de 8 horas. Para o grupo experimental, inoculado com carragenina e tratado com extrato de *M. chamaedrys* foi possível observar que a carragenina induziu um aumento na espessura da pata, porém os valores retornaram ao normal após o período de 3 horas (Tabela 2).

**Tabela 1** – Análise do grupo inoculado com carragenina. A letra (a) representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

<b>Grupo Controle</b>	<b>0h</b>	<b>1h</b>	<b>3h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>
<b>Pata Direita</b>	0,222± 0,018	0,228± 0,011	0,230±0,012	0,222±0,013	0,222±0,011
<b>Pata esquerda</b>	0,222± 0,011	0,274±0,011 (a)	0,302±0,016 (a)	0,276±0,017 (a)	0,256±0,021

**Tabela 2** - Análise do grupo experimental com o extrato macerado de *M. chamaedrys*. (a) representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

<b>Grupo Experimental</b>	<b>0h</b>	<b>1h</b>	<b>3h</b>	<b>6h</b>	<b>8h</b>
<b>Pata Direita</b>	0,214±0,022	0,220±0,014	0,220±0,007	0,218± 0,013	0,214±0,009
<b>Pata esquerda</b>	0,224±0,025	0,270±0,021 (a)	0,262±0,011 (a)	0,260±0,012	0,248±0,008

Em seguida foi realizada uma análise comparativa entre os grupos controle e experimental, que indicou uma redução significativa na espessura da pata dos animais tratados quando comparado ao grupo controle inoculado somente com carragenina para os períodos de 1h e 3h ( $p < 0,05$ ). O que sugere que o extrato de *M. chamaedrys* pode causar a inibição do edema nos períodos iniciais do desafio com carragenina (Fig. 05).

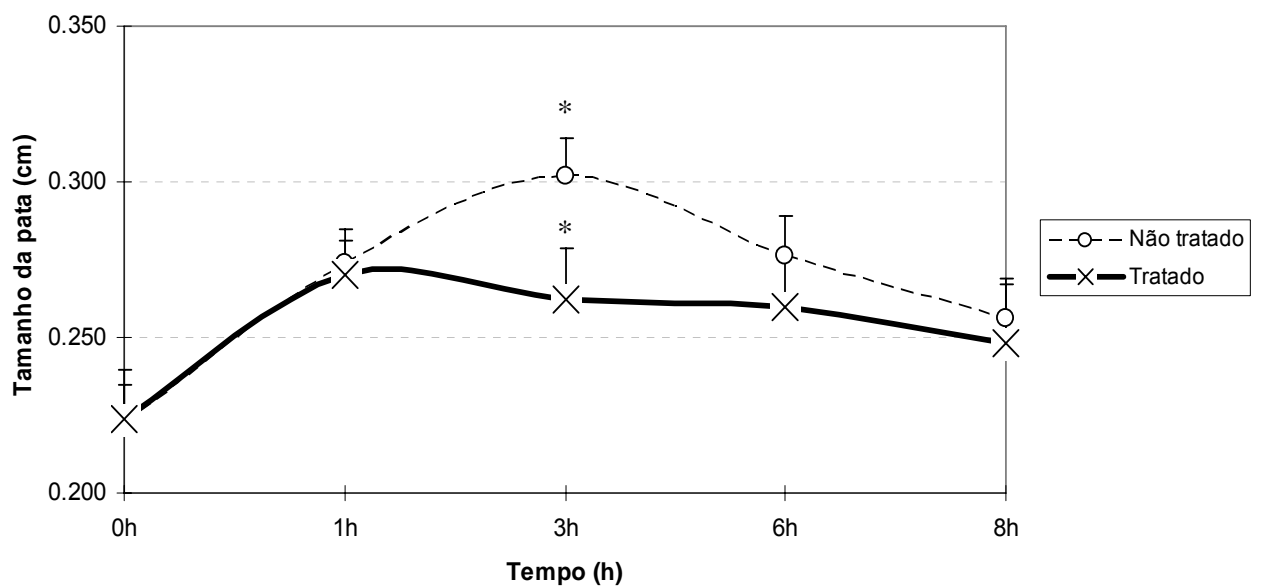


Figura 05 – Análise intergrupos da variação na espessura da pata de camundongos inoculados com carragenina e tratados com o extrato de *M. chamaedrys*. \*  $p < 0.05$

## 5.2. Contagem total de leucócitos

Nos animais não tratados, houve um aumento do número de leucócitos totais no período de 3h retornando aos níveis basais em 8h. Nos animais tratados, ocorreu um aumento no período de 1h, diminuindo significativamente em 3h e retornando aos níveis basais em 8h (Fig. 06).

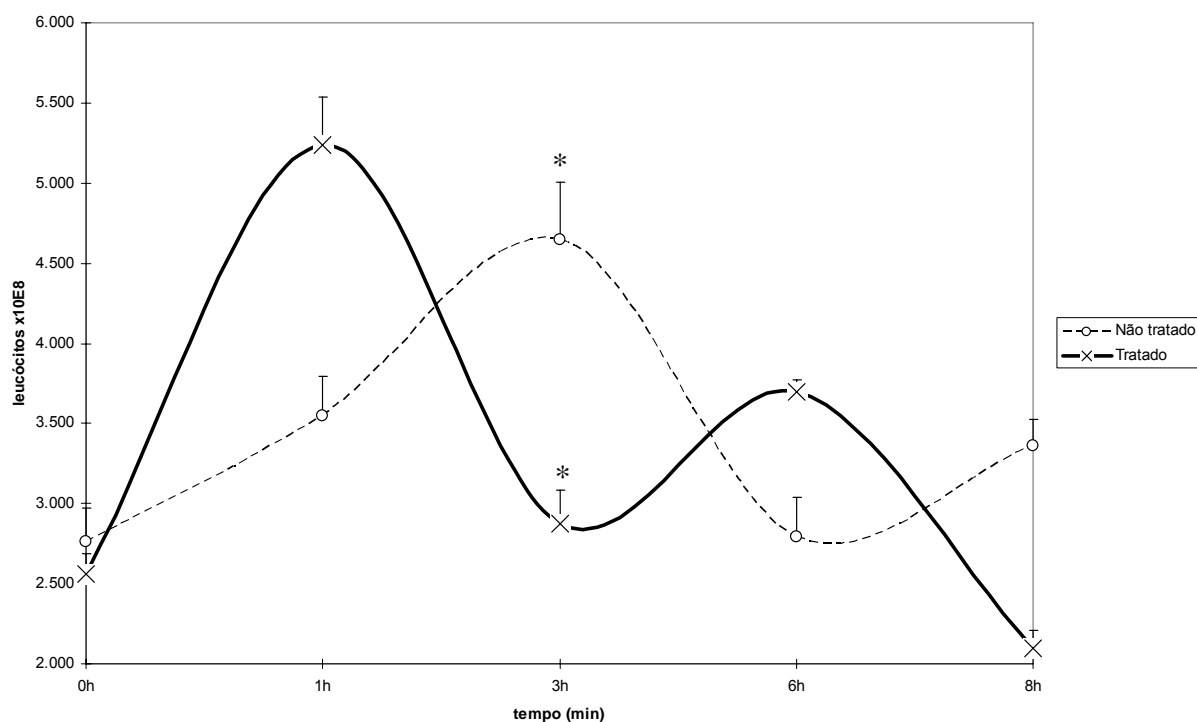


Figura 06 - Análise intergrupos da contagem total de leucócitos. Diminuição significativa no período de 3h no grupo experimental em relação ao controle. \* ( $p < 0,05$ ).

### 5.3. Contagem diferencial de leucócitos

#### 5.3.1. Linfócitos

A análise intra-grupos de linfócitos nos animais não tratados, indicou um aumento significativo no intervalo entre 3 a 8 h. Nos animais tratados, indicou um aumento significativo nos intervalos entre 0 a 6h, 1 a 6h e 3 a 6h ( $p < 0,05$ ) e uma diminuição significativa no intervalo entre 6 a 8h ( $p < 0,05$ ). A análise inter-grupos (Fig. 07) indicou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no período de 6h entre os animais tratados (11%) e não tratados (36%).

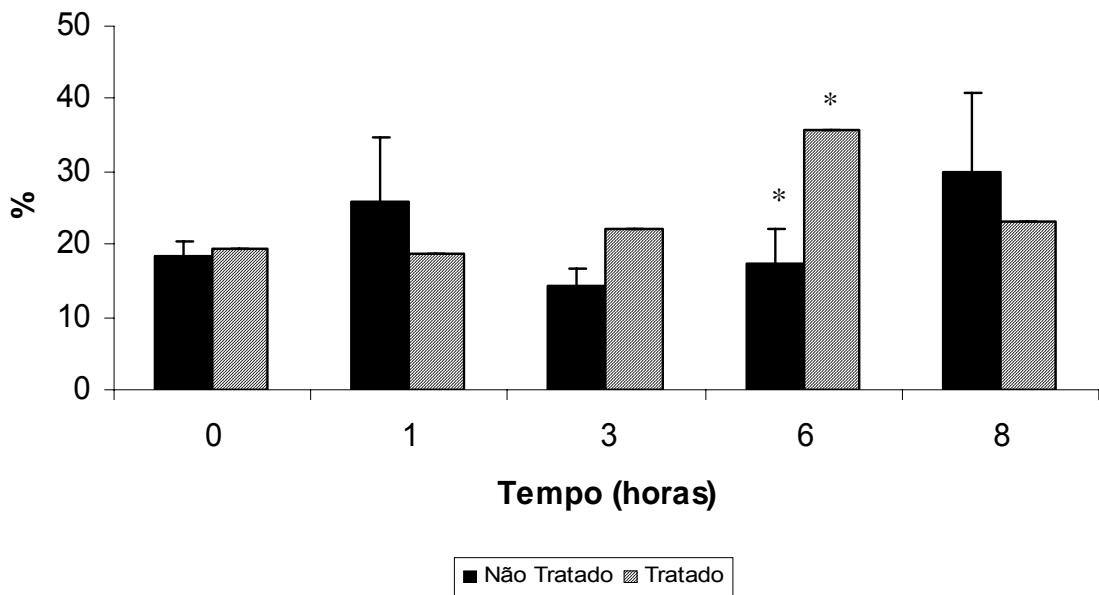


Figura 07 - Análise intergrupos da contagem diferencial de linfócitos. \*  $p < 0.005$

### 5.3.2. Polimorfonucleares

A análise intra-grupos de polimorfonucleares nos animais não tratados, indicou uma diminuição significativa nos intervalos entre 3 a 8 h e 6 a 8h ( $p < 0.05$ ). Nos animais tratados, indicou uma diminuição significativa nos intervalos entre 0 a 6h, 1 a 6h e 3 a 6h ( $p < 0.05$ ) e um aumento significativo no intervalo entre 6 a 8h ( $p < 0.05$ ). A análise inter-grupos (Fig. 08) indicou uma diminuição significativa ( $p < 0.05$ ) no período de 6h entre os animais tratados (64%) e não tratados (89%).

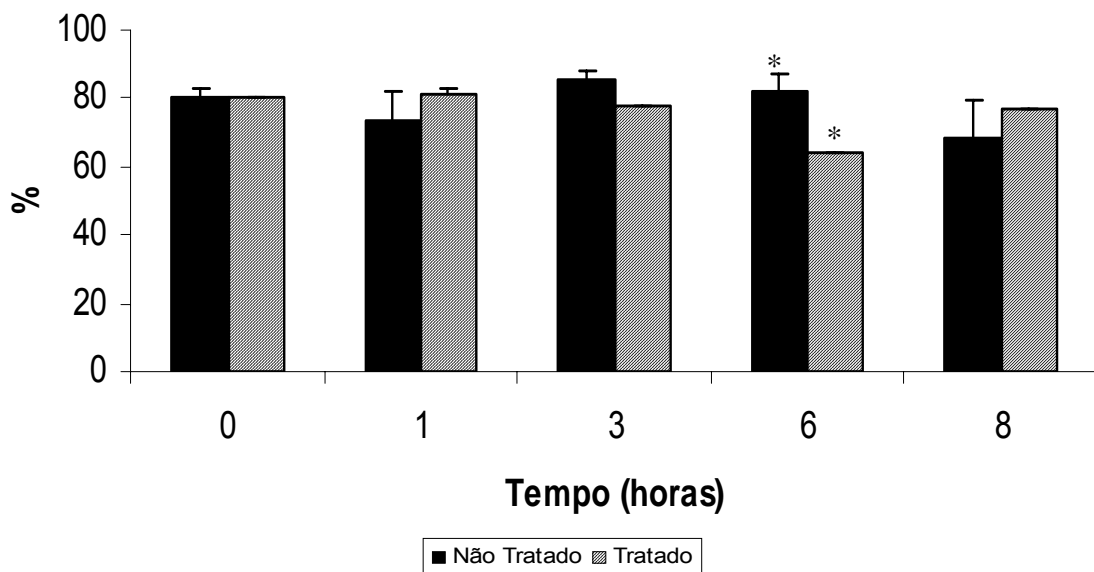


Figura 08 - Análise intergrupos da contagem diferencial de polimorfonucleares. \*  $p < 0.05$

### 5.3.3. Monócitos

A análise intra-grupos de monócitos nos animais não tratados, indicou uma diminuição significativa nos intervalos entre 0 e 1, 3, 6 e 8h ( $p < 0.05$ ). Nos animais tratados, não houve diferenças significativas em nenhum período (Fig 09).

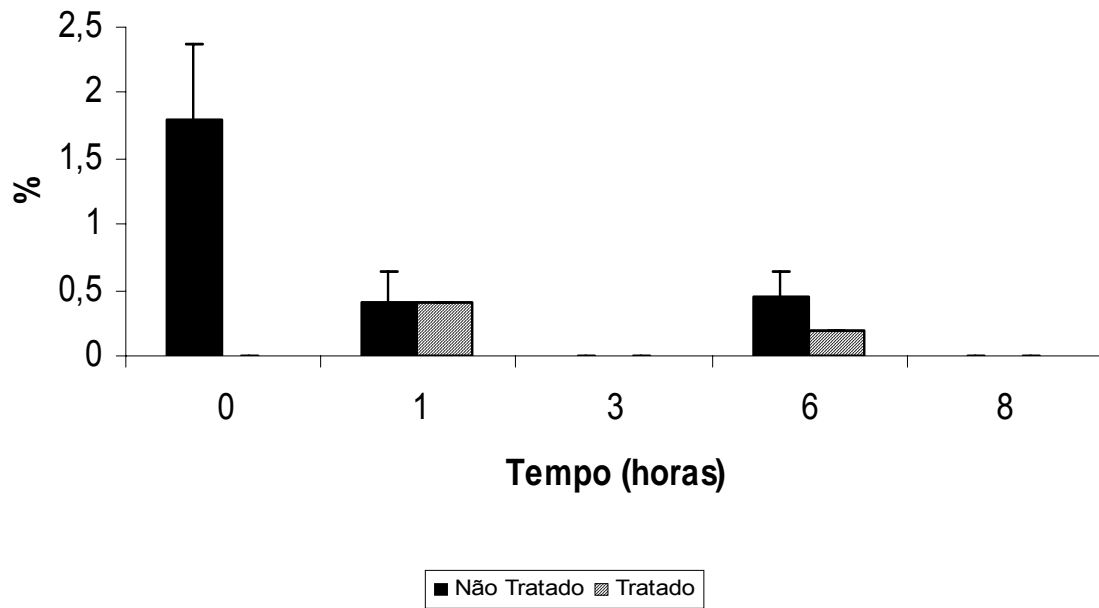


Figura 9 - Análise intergrupos da contagem diferencial de monócitos.

#### 5.4. Análise histopatológica

A análise dos cortes histológicos (Fig. 10) demonstrou que tanto para o grupo controle quanto para o grupo experimental, o processo inflamatório foi caracterizado pela presença de edema com intensidade que variou de discreta a moderada. Quase nenhum infiltrado de células inflamatórias foi observado na primeira hora, porém nos períodos subseqüentes houve um aumento progressivo da quantidade de infiltrado inflamatório subcutâneo e também edema. Estas alterações foram mais evidentes para o grupo controle, no qual observou-se intenso infiltrado inflamatório a partir de 3 horas, e também observou-se edema mais acentuado que o grupo experimental (Tabela 3). No grupo controle após 8 horas da inoculação com carragenina foi observado um intenso infiltrado neutrofílico, que, em algumas áreas da derme apresentavam arranjo de microabcesso.

Em ambos os grupos, controle e experimental, observou-se:

- 1) predomínio de infiltrado inflamatório neutrofílico, o que é esperado para esses tempos (inflamação aguda).
- 2) presença no subcutâneo, de alguns mastócitos com o citoplasma amplo e basofílico (bastante granulado).
- 3) edema e infiltrado inflamatório em planos mais profundos (Tecido adiposo e musculatura) a partir de tempos finais de 6 e 8 horas.

**Tabela 3** - Escore histopatológico do coxim plantar dos camundongos dos grupos controle (C) e experimental (E). 0 – Inexistente; 1 – Fraco; 2 – Moderado; 3 – Médio; 4 – Intenso; 5 – Muito intenso.

	Edema subcutâneo	Quantidade de células inflamatórias	Tipo de cel inf. Predom	Congestão/hiperemia	Hemorragia
<b>C 0h</b>	0	0	0	0	0
<b>C 1h</b>	3	1	Neutrófilos	1	1
<b>C 3h</b>	3	4	Neutrófilos	2	2
<b>C 6h</b>	3	5	Neutrófilos	3	3
<b>C 8h</b>	4	5	Neutrófilos	3	2
<b>E 1h</b>	2	1	Neutrófilos	1	1
<b>E 3h</b>	3	2	Neutrófilos	1	1
<b>E 6h</b>	3	5	Neutrófilos	2	2
<b>E 8h</b>	3	4	Neutrófilos	3	2

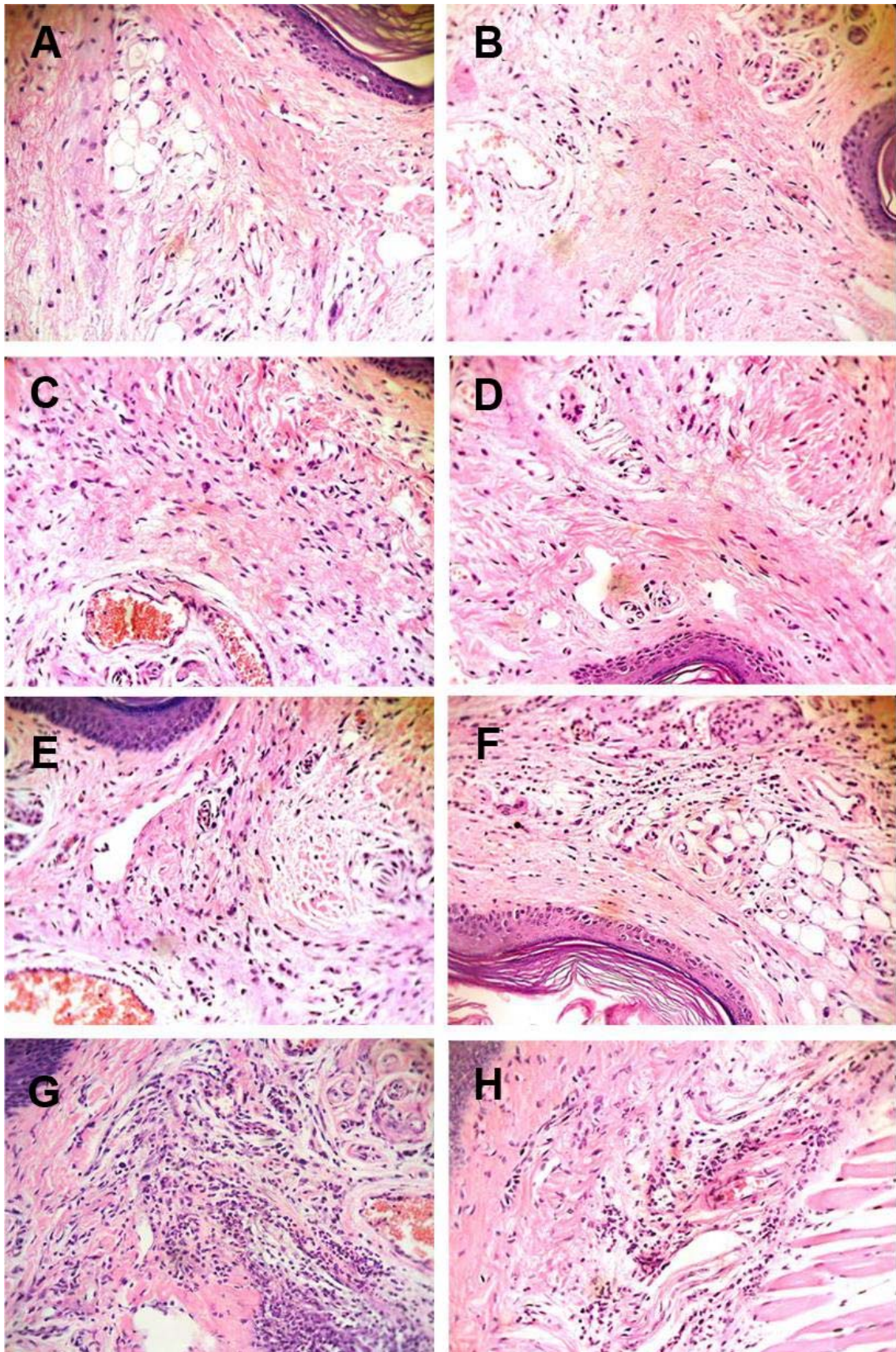


Figura 10: Análise Histopatológica – A - 1h controle; B - 1h experimental; C- 3h controle; D- 3h experimental; E - 6h controle; F - 6h experimental; G - 8h controle; F - 8h experimental. Aumento 400X . Fotografia: Denizar Missawa Camurça, 2008

## 6. DISCUSSÃO

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% de acidentes ofídicos na América Latina. O veneno destes animais induz efeitos locais e sistêmicos, tais como inchaço, hemorragia, desordens hemostáticas e nefrotoxicidade (Otero et al., 2000b) semelhantes aos sintomas da inflamação. Segundo Silva e Mota (2003), a morfologia da inflamação aguda consiste em alterações no calibre dos vasos e aumento do fluxo sanguíneo, alterações morfofuncionais na microcirculação resultando na saída de plasma e células sanguíneas da circulação, migração de leucócitos e seu acúmulo no tecido inflamado, hiperemia seguida de edema e hemorragia após alguns minutos. Muitas pessoas que vivem em zonas rurais e comunidades isoladas não possuem os recursos médicos necessários e os doentes recorrem aos curandeiros tradicionais (Otero et al., 2000a) que utilizam medicamentos naturais para tratamento de picadas de cobras, sendo indicados principalmente para aliviar inchaço e hemorragia (Otero et al., 2000b).

A *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze é conhecida pelos nomes populares: “Paracari”, “Hortelã do Brasil”, “Bóia-caá” ou “Erva de cobra”. O nome vernacular “Bóia-caá” significa na língua Tupi “Erva de cobra”, enquanto os nomes “Paracari” e “Hortelã do Brasil” também são designados para outra planta da mesma família *Peltodon radicans* Pohl que possui efeito antiedematogênico (Costa et al., 2004) inclusive frente ao edema causado por veneno de *Bothrops atrox* (Cavalcanti Neto et al., 1994; Costa et al., 2006). Esta planta também é utilizada na etnomedicina contra picadas de cobras, principalmente na região norte (Dos Santos et al., 1996). É muito comum à confusão de nomes vernaculares, existindo vários nomes para uma determinada espécie ou um mesmo nome vernacular para mais de uma espécie (Ehringhaus, 2003), como é o caso da *M. chamaedrys* e *P. radicans*. Neste estudo, a identificação da espécie *M. chamaedrys* foi feita por Moacir Biondo, professor de fitoterapia do curso de medicina da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Menezes (1998) cita na constituição química da *M. chamaedrys* a presença de fitoesteróides (sitosterol e stigmasterol) e de triterpenos (ácido ursólico, ácido tormêntico e ácido oleanólico). Estudos mostram que fitoesteróides apresentam

atividades antiinflamatórias (Mbaze et al., 2007) podendo ser relacionadas com a neutralização do efeito inflamatório dos venenos botrópicos (Costa et al., 2004).

A atividade antiinflamatória dos triterpenos tem sido atribuída pelas interações com receptores glicocorticóides, com efeitos antiinflamatórios localizados (Recio et al., 1995). Os glicocorticóides previnem o início da cascata de reação que leva a produção de certas prostaglandinas e leucotrienos através da diminuição de oferta do ácido araquidônico. Também ocorre diminuição da permeabilidade do endotélio capilar evitando o extravasamento de líquidos e proteínas para fora dos capilares, diminuindo assim a formação de edema. Os glicocorticóides inibem também a marginalização e migração de leucócitos evitando que esses se aproximem da área lesada, ocorrendo inclusive a diminuição de células que chegam ao local da lesão. O acúmulo de leucócitos no local da inflamação pode ser suprimido até 12h após dose única de corticóides (Silva, 2006). O ácido ursólico é encontrado com facilidade no reino vegetal, apresentando propriedades anti-edematogênica e antiinflamatória (Banno et al., 2004) Por sua vez, o ácido tormêntico é menos freqüente em espécies vegetais, apresentando também atividade antiinflamatória. (Liu, 1995).

A utilização do extrato macerado total (folhas e flores) possibilitou a extração de diversos princípios ativos que poderiam ser encontrados apenas nas folhas ou as flores como é o caso desses dois triterpenóides, encontrados apenas nas flores de plantas da família Lamiaceae (Menezes et al., 1998) e estão relacionados com a atividade antiedematogênica (Kim et al., 1999) descrita popularmente e confirmada pelos testes biológicos realizados neste trabalho. Apesar do extrato macerado teoricamente conter toda a gama de princípios ativos, no presente estudo não ocorreu a identificação dos metabólitos secundários da planta que estavam presentes no extrato utilizado no grupo experimental. A diminuição do edema descrita neste estudo sugere um efeito antiinflamatório, possivelmente desencadeado pela inibição de prostaglandinas devido aos esteróides e terpenóides constituintes da planta. Entretanto o infiltrado inflamatório presente em ambos os grupos, controle e experimental, principalmente nos períodos de 6 e 8h demonstra provavelmente uma ação maior dos terpenóides do que dos esteróides constituintes da planta, já que estes promovem diminuição da oferta do ácido araquidônico e conseqüentemente a diminuição dos mediadores humorais da inflamação como a prostaglandinas e principalmente o leucotrieno, que atua em receptores específicos, faz quimiotaxia para neutrófilos, ativação de polimorfonucleares e monócitos, além

de estimular a proliferação de macrófago e linfócitos e produção de citocinas destas células (Silva, 2006).

A contagem total de leucócitos indicou, na análise inter-grupos, um aumento de células no período de 1h e uma diminuição significativa no período de 6h. A contagem diferencial indicou um aumento de linfócitos no período de 6h, Ortega et al. (1997) citam o aumento de linfócitos relacionados com os níveis de cortisol no sangue. Menezes et al. (1999) citam a presença de fitoesteróides com semelhança funcional dos corticóides. Possivelmente este aumento de linfócitos na corrente sanguínea é decorrente da presença destes compostos esteróides no extrato da *M. chamaedrys*. Notou-se também uma diminuição de polimorfonucleares no mesmo período (6h). Na análise histológica ocorreu no período de 6h o escore mais alto para o infiltrado de predominância polimorfonuclear, sugerindo uma migração dos neutrófilos da corrente sanguínea para o tecido neste período.

Embora o presente estudo tenha contribuído para o conhecimento das propriedades medicinais da *M. chamaedrys* sobre a resposta inflamatória, novos estudos que avaliem a composição química dos extratos *M.chamaedrys* de partes isoladas da planta como: flores, folhas, raiz; bem como o isolamento dos princípios ativos devem ser realizados para determinar com precisão qual o componente da planta que apresenta atividade antiinflamatória.

## 7. CONCLUSÃO

- ⇒ O extrato macerado liofilizado da *Masypianthes chamaedrys*, quando solubilizado em solução salina em uma concentração de 10mg/mL demonstrou atividade antiedematogênica no modelo do coxim plantar de camundongos inoculados com carragenina;
  
- ⇒ A análise histopatológica indicou um infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos em ambos os grupos, experimental e controle, aprofundando-se em camadas musculares e adiposas nos tempos finais 6 e 8 h. Demonstrando que o extrato da *M. chamaedrys* não promove a diminuição do infiltrado de células inflamatórias;
  
- ⇒ A contagem total de leucócitos indicou um aumento de células no período de 1h e uma diminuição significativa no período de 6h. A contagem diferencial indicou um aumento de linfócitos no período de 6h, possivelmente decorrente de constituintes químicos da planta e uma diminuição de polimorfonucleares no mesmo período, que provavelmente migraram para o local da inflamação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Higashihara H, UKIYA M, Watanabe K, Kimura Y, Hasegawa J, Nishino H. Triterpene Acids from the Leaves of *Perilla frutescens* and Their Anti-inflammatory and Antitumor-promoting Effects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2004; 68(1): 85-90.

Barraviera B. *Venenos: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos*. 1ª ed. Rio de Janeiro: EPUB; 1999.

Buck CB, Thompson CD, Roberts JN, Müller M, Lowy DR, Schiller JT. Carrageenan Is a Potent Inhibitor of Papillomavirus Infection. *Plos Pathogens*. 2006; 2(7):671-680.

Cavalcanti Neto AJ, Borges CC, Boechat ALR, Dias AV, Santos WC, Arruda LFMR, Dos-Santos MC. Efficacy Verification Of The Plant *Peltodon radicans* In The Neutralization Of Main Biological Activities Of *Crotalus Durissus Ruruima* And *Bothrops Atrox* Venoms. In: III Reuniao Da Sociedade Brasileira De Toxinologia: Anais da III Reunião da Sociedade Brasileira de Toxinologia; 1994; Belo Horizonte.

Castro KNC, Carvalho ALO, Almeida AP, Oliveira DB, Borba HR, Costa SS, et al. Preliminary in vitro studies on the *Marsipianthes chamaedrys* (bóia-caá) extracts at fibrinoclotting induced by snake venoms. *Toxicon*. 2003; 41: 929-932.

Costa HNR, Alcântara AFC, Baiocco GV. Estudo fitoquímico de *Peltodon radicans* biomonitorado por testes de ação bloqueadora de atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*. In: XIII Congresso de Iniciação Científica da UFAM: Livro de Resumos do XIII Congresso de Iniciação Científica da UFAM; 2003/2004; Manaus. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2004. p. 18-18.

Costa PI, De Lima EG, Laure CJ. Rattlesnake venom: Action upon erythrocytes and leucocytes of rats. *Acta Physiol. Pharmacol Latinoam*. 1989; 39:359-373.

Di-Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica. 2ªed. São Paulo: Editora UNESP; 2002.

Dos Santos MC, Franciscon CH, Arruda LF. Eficácia da Espécie vegetal *Peltodon radicans* Pohl (Labiatae=Lamiaceae) na neutralização da atividade edematogênica e a ineficácia do extrato vegetal específico Pessoa na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops atrox*. Revista da Universidade do Amazonas. Série Ciências Agrárias. 1996; 1:97-113.

Ehringhaus C, De Los Rios MM, Silveira M, Saraiva S, Campos MTVA. Variabilidade e incerteza em nomes populares de plantas no Acre: implicações para o manejo de recursos naturais. In: Anais do 54º Congresso Nacional De Botânica; 2003; Ananindeu-Belém-Pará.

Hansberger JW. The origin of our vernal flora. Science. 1985; 1(4): 92-98.

Kellen EMA, Rosenfeld G, Nudel F. Hemolytic activity of animal venoms II. Variation in relation to erythrocyte species. Mem. Inst. Butantan. 1962; 30:133-142.

Kim SY, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Inhibition of mouse ear edema by steroidal and triterpenoid saponins. Arch Pharm Res. 1999 22(3): 313-316.

Lemos VAA. Avaliação do Potencial Antiinflamatório do Extrato Etanólico e Aquoso de Própolis em Camundongos (*Mus musculus*). [Trabalho de Conclusão de Curso]. Guarulhos: Universidade Guarulhos; 2007.

Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. Journal of Ethnopharmacology. 1995; 49(2): 57-68.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 1ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga-Jr VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Quim Nova. 2002; 25(3):429-438.

Martz, W. Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon*. 1992; 30(10):1131-1142.

Mbaze LM, Poumale HMP, Wansi JD, Lado JA, Khan SN, Iqbal MC, et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory pentacyclic triterpenes from the stem bark of *Fagara tessmannii* (Rutaceae). *Phytochemistry*. 2007; 68(5): 591-595.

Menezes FS, Borsato AS, Pereira NA, Matos FJA, Kaplan MAC. Chamaedrydiol, an ursane triterpene from *Marsypianthes chamaedrys*. *Phytochemistry*. 1998; 48(2):323-325.

Menezes FS, Silva CA, Borsato AS, Pereira NA, Matos FJA, Kaplan MAC. Molluscicidal Constituents of *Marsypianthes chamaedrys*. *Phytother. Res*. 1999; 13: 433-435.

Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek G. Cytokines. In: Stites DP, Terr AI. *Basic and Clinical Immunology*. 7<sup>a</sup> ed. Norwalk, Conn: Appleton & Lange; 1991. p. 78-100.

Ortega E, Forner A, Barriga C. Exercise-induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterone and prolactin as mediators. *J Physiol (Lond)*. 1997; 498:729-734.

Otero R, Nunez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio RG, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colômbia. Part II: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000 b; 73:233-241.

Otero R, Nunez V, Jiménez SL, Fonnegra R, Osorio RG, García ME, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colômbia. Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000 a; 71:505-511.

Posey DA. In: Ribeiro BG. *Suma Etnológica Brasileira. Etnobiologia*. Petrópolis: Editora Vozes; 1986.

Recio MC, Giner RM, Máñez S, Gueho J, Julien HR, Hostettmann K, et al. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med.* 1995; 61(1): 9-12.

Roch-Arveiller M, Giroud JP. Biological and pharmacological effects of carrageenan. *Pathol Biol (Paris)*. 1979; 27(10):615-626.

Roitt IM, Delves PJ. *Fundamentos de Imunologia*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Schultes RE. The role of the ethnobotanist in the search for new medicinal plants. *Lloydia*. 1962; 25:257.

Silva P. *Farmacologia*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Silva WD, Mota I. *Imunologia básica e aplicada*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

ANEXO A - Exsicata de *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze depositada no herbário do Missouri Botanical Garden (MOBOT)



