



AValiação DA ATIVIDADE ANTIOFÍDICA DO EXTRATO DE *Spondias tuberosa*

Daniel Medeiros Nunes¹
daniel.medeirosnunes@upe.br
Maria Isabela Ferreira de Araujo²
isabelamfaraujo@gmail.com
Luiza Rayanna Amorim de Lima¹
luiza.amorim@upe.br
Natalie Emanuelle Ribeiro Rodrigues¹
natalie.rodrigues@upe.br
Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque¹
priscilla.albuquerque@upe.br

¹Universidade de Pernambuco

²Universidade Federal de Pernambuco

INTRODUÇÃO

Acidentes com serpentes peçonhentas constituem um grave problema de saúde pública mundial. Vítimas de acidente por jararaca (*Bothrops jararaca*) costumam apresentar efeitos sistêmicos, além de complicações locais, como necrose, edema, inflamação e hemorragia (Gutiérrez *et al.*, 2017). O tratamento para os casos de envenenamento consiste na administração do soro antiofídico, que é capaz de neutralizar toxinas e reverter os efeitos sistêmicos. No entanto, ele apresenta ação limitada, não impedindo o agravamento de complicações locais. Nesse sentido, a busca por alternativas complementares é fundamental, principalmente em regiões rurais, onde o acesso ao soro antiofídico é difícil, destacando-se o de plantas medicinais como terapia alternativa (Moura *et al.*, 2015).

O umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) é uma planta nativa do Nordeste comumente utilizada na medicina tradicional. Suas folhas são ricas em flavonoides e compostos fenólicos, além de ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina e isoquercitrina, os quais têm potencial antiofídico (Carvalho *et al.*, 2013). Devido à composição fitoquímica de *S. tuberosa*, a utilização de extratos de suas folhas poderia diminuir o dano tecidual necrótico induzido pelas toxinas da peçonha. No entanto, pela instabilidade inerente aos compostos fenólicos, assim como a dificuldade de aplicação tópica de substâncias líquidas, a imobilização dos extratos em suportes poliméricos desponta como uma alternativa promissora.

Como fonte alternativa de suporte polimérico natural, destaca-se a galactomanana extraída das sementes de *Cassia grandis*, a qual já foi extensivamente caracterizada, testada como gel, matriz para imobilização de biomoléculas e agente cicatrizante (Abuquerque *et al.* 2017). Pelas propriedades inerentes e por ter comprovadas atividades biológicas, o gel deste polissacarídeo possui potencial a ser explorado. Neste sentido, o presente trabalho se propôs a avaliar as atividades antifosfolipásica e antinecrosante *in vivo* do extrato hidroalcóolico das folhas de *S. tuberosa* (EHFSt) imobilizado em gel de galactomanana frente à necrose induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* em camundongos Swiss.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material vegetal e produção do extrato

As folhas de *S. tuberosa* foram coletadas, secas e em seguida moídas. Para a obtenção do extrato, a matéria-prima vegetal foi submetida à maceração por 7 dias (10:100, m/v) usando água-etanol (30:70 v/v). Em seguida, o extrato hidroalcóolico (EHFSt) foi filtrado e concentrado em rotaevaporador. As principais classes de metabólitos secundários foram avaliadas de forma qualitativa por reação química.

Extração da galactomanana, produção do gel e imobilização do EHFSt

As vagens de *C. grandis* foram coletadas no Agreste Pernambucano e submetidas à extração de acordo com Albuquerque *et al.* (2014). O gel de galactomanana foi produzido a partir de uma solução aquosa do polissacarídeo a 1,2 % (p/v) e o EHFSt foi imobilizado a 15% por enclausuramento.



Obtenção da peçonha e do soro antiofídico

A peçonha liofilizada de *Bothrops jararaca* foi fornecida pelo Instituto Butantan, SP, Brasil. O soro antiofídico (Soro Antiofídico Polivalente Liofilizado ® LEMA Biologic do Brasil LTDA) foi adquirido em petshop comercial, sendo mantido refrigerado até o uso.

Atividade antifosfolipase

Para a avaliação da atividade antifosfolipásica, o EHFSt nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL foi pré-incubado por 60 min a 37°C em solução contendo a peçonha (10µg/30mL) antes de ser exposto à suspensão de gema de ovo incorporada em agarose 1%. Após 24h de incubação foram mensurados os halos de degradação dos fosfolipídeos, conforme descrito por (Habermann; Hardt, 1972).

Manutenção dos animais e avaliação da capacidade antinecrosante e cicatrizante do EHFSt-gel

Camundongos machos da linhagem Swiss com 60 dias foram mantidos sob condições ambientais controladas e com água e ração foram *ad libitum*. O uso animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) UPE sob registro de nº 007/2022. Para a avaliação cicatrizante e antinecrosante, 72 camundongos foram tricotomizados em região dorso cervical e divididos de forma aleatória em 3 grupos experimentais (n=24), avaliados e tratados durante 2, 7 e 12 dias de acordo com a metodologia proposta por Machado (2015). Cada grupo, por sua vez, foi dividido em 4 subgrupos (n=6) e todos os animais receberam 50 µL/50µg de peçonha via intradérmica. Os tratamentos variaram de acordo com os grupos: G1 (não tratado), G2 (tratado com soro antiofídico), G3 (tratado com EHFSt-gel) e G4 (tratado com soro antiofídico e EHFSt-gel). Todos os animais foram examinados diariamente quanto ao aspecto geral, observando a presença ou ausência de hemorragia, exsudato e crosta, presença ou não da perda de pêlos e bordas da ferida. Ao final dos dois dias de tratamento experimental, os animais foram eutanasiados para a retirada da área de pele necrosada.

Análise morfométrica da área necrosada e análise histológica das lesões

Para a análise morfométrica das áreas necrosadas os animais foram fotografados no 2º, 7º e 12º dia de tratamento. As imagens foram transferidas para um computador e analisadas utilizando-se o software Image J 1.3.1 (NIH, EUA). A área lesionada foi dissecada, fixada em formol e, após processamento histológico de rotina, foi corada com hematoxilina-eosina (H.E).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) e análise de regressão linear (SigmaStat, 2003, EUA). O teste t de Student e/ou o teste de Mann-Whitney também foram empregados. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabe-se que o dano tecidual causado pelos venenos botrópicos é resultado da ação de enzimas, principalmente proteases e fosfolipases, que causam lesões nas paredes de pequenos vasos sanguíneos, sangramento, isquemia e edema ou mesmo dano celular por rompimento direto da membrana plasmática. O EHFSt nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL apresentou redução significativa ($p < 0,05$) no halo de degradação, o que demonstra inibição na enzima fosfolipase, que é a responsável pela degradação dos lipídeos do meio. As atividades biológicas esperadas para o extrato em questão podem ser relacionadas com os resultados da caracterização fitoquímica, que demonstrou a presença de fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonas e esteroides.

A cicatrização é uma resposta à destruição tecidual que inclui o processo de regeneração e reparo pela substituição de células danificadas por tecido fibroso e suas etapas incluem inflamação, proliferação e maturação, os quais ocorrem que ocorrem simultaneamente. Em relação à atividade antinecrosante e cicatrizante, a análise morfométrica das feridas não apresentou diferença estatística em relação à contração no 2º dia de análise. No 7º dia de avaliação, G1 (1%), G2 (57,2%), G3 (70,9%) e G4 (85,7%) apresentaram resultados diferentes, com taxas de contração estatisticamente maiores nos grupos tratados



(G2, G3 e G4) do que no controle (G1). Ao final do 12º dia, todos os grupos apresentaram reepitelização, e G1 formou uma cicatriz maior que os demais grupos.

A análise microscópica evidenciou que os tecidos de todos os grupos experimentais (G1, G2, G3 e G4) avaliados durante 2 dias apresentavam-se semelhantes, sendo observada uma extensa área de lesão, com células inflamatórias infiltradas e presença de crosta na área necrosada. No sétimo dia de avaliação pôde-se observar melhor reestruturação tecidual e rearranjo de colágeno mais uniforme nos grupos G3 e G4. Os tecidos dos animais avaliados durante 12 dias apresentavam-se completamente cicatrizados, com reestabelecimento da arquitetura tecidual, mas mantendo-se o padrão deposição de colágeno de forma mais uniforme nos grupos tratados G3 e G4. Esses resultados são condizentes com dados prévios relatados na literatura, como o evidenciado por Machado *et al.* (2015) para o extrato das cascas de *Croton urucurana* e por Delmut *et al.* (2013) para o extrato das folhas de *Cassia occidentalis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, foi possível perceber que o extrato hidroalcolólico das folhas de *S. tuberosa* foi capaz de inibir a degradação de fosfolipídeos frente à peçonha de *B. jararaca*, bem como foi capaz de acelerar o processo de cicatrização de feridas necróticas de camundongos inoculados com a peçonha, sendo verificada pela contração macroscópica da área lesionada e pelo rearranjo uniforme de fibras colágenas nos grupos tratados quando comparado ao controle. Dessa forma, o EHFSt-gel desponta como uma promissora formulação tópica a servir de aliada ao soro antiofídico.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas medicinais. Acidente ofídico. Necrose.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à UPE e à FACEPE pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

- ALBUQUERQUE, P. B. S. *et al.* Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. **Carb. Pol.**, v.104, p.127-134, 2014.
- ALBUQUERQUE, P. B. S. *et al.* Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 102, p. 749-757, 2017.
- CARVALHO, B. M. A. *et al.* Snake Venom PLA2s Inhibitors Isolated from Brazilian Plants: Synthetic and Natural Molecules. **J. of Biomed. Biotechnol.**, p. 1-8, 2013.
- DELMUT, M. B. *et al.* *Cassia occidentalis*: effect on healing skin wounds induced by *Bothrops moojeni* in mice. **J. Pharm. Technol. Drug Res.**, v. 2, n. 10, p. 1-6, 2013.
- GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v. 3, p. 1- 20, 2017.
- HABERMANN, E.; HARDT, K. L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analytical Biochemistry**, v. 50, p. 163-173, 1972.
- MACHADO, L.C.S. *et al.* Cicatrização de feridas induzidas por peçonha de *Bothrops moojeni* pelo extrato de *Croton urucurana*. **Estudos**, v. 42, n. 4, p. 597-611, 2015.
- MOURA, V. M. *et al.* Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **J. Ethnopharmacol.**, v. 161, 224–232, 2015.