



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**MESTRADO MULTIDISCIPLINAR EM**  
**PATOLOGIA TROPICAL**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÓLEO DE ANDIROBA**  
**(*Carapa guianensis* Aublet, 1775) NA INFLAMAÇÃO LOCAL**  
**INDUZIDA POR VENENOS DE SERPENTES AMAZÔNICAS**

**WALLY VICTORIA FABIENNE KRIGER ANTONY SPOSINA**

**MANAUS**

**2005**

**WALLY VICTORIA FABIENNE KRIGER ANTONY SPOSINA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÓLEO DE ANDIROBA  
(*Carapa guianensis* Aublet, 1775) NA INFLAMAÇÃO LOCAL  
INDUZIDA POR VENENOS DE SERPENTES AMAZÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração “Etnomedicina e Biodiversidade”, e na linha de pesquisa “Princípios Bioativos Pró-saúde em Recursos Naturais Amazônicos”.

Orientador: **Prof Dr. Jorge Luis López-Lozano**

Co-Orientador: **Prof Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira**

**MANAUS**

**2005**

**WALLY VICTORIA FABIENNE KRIGER ANTONY SPOSINA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÓLEO DE ANDIROBA  
(*Carapa guianensis* Aublet, 1775) NA INFLAMAÇÃO LOCAL  
INDUZIDA POR VENENOS DE SERPENTES AMAZÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração “Etnomedicina e Biodiversidade”. e na linha de pesquisa “Princípios Bioativos Pró-saúde em Recursos Naturais Amazônicos”.

Aprovada em 30 de Setembro 2005.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>o</sup>. Dr. JORGE LUIZ LÓPES-LOZANO, Presidente  
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas FMT AM

Prof. Dr. DIRCEU BENEDICTO FERREIRA, Membro Interno  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr<sup>a</sup>. SANDRA PATRÍCIA ZANOTTO, Membro Externo  
Universidade Estadual do Amazonas

S764a Sposina, Wally Victoria Fabienne Kriger Antony.  
Avaliação da atividade do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet, 1775) na inflamação local induzida por venenos de serpentes amazônicas / Wally Victoria Fabienne Kriger Antony Sposina; Orientador: Jorge Luiz López-Lozano; Co-orientador Luiz Carlos de Lima Ferreira. Manaus, AM: UFAM, 2005. 106 f. : il.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas.

1. Acidentes ofídicos – inflamação local 2. *Bothrops atrox* 3. *Crotalus durissus ruruima* 4. *Carapa guianensis* 5. Andiroba I. López-Lozano, Jorge Luiz, Ferreira, Luiz Carlos de Lima. II. Título.

CDU: 616.5-002.5

Aos meus pais **Wally Diana** (*in memoriam*) e **Gigio**,  
Às tias **Priscilla e Lucille** e  
Aos meus irmãos **Vivien e Jos**  
pelo carinho e apoio.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter sempre me protegido, guiado e amparado nos momentos mais difíceis.

Aos **meus pais Wally Diana e Gigio e toda a minha família** pelo apoio e compreensão.

Ao Dr. **Jorge Luiz López-Lozano**, pela paciência, confiança e incentivo e por todo o conhecimento científico partilhado.

Ao Dr. **Luiz Carlos de Lima Ferreira**, pela confiança, serenidade e incentivo, e pelos conhecimentos científicos partilhados.

Ao Dr. **Nelson Abraham Fraiji**, Coordenador do Curso de Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical – UFAM, pelo incentivo.

A Dra. **Maria Rosa Lozano Borrás**, pela orientação farmacológica concedida.

Ao Dr. **Emerson da Silva Lima**, pela enorme ajuda em enviar artigos essenciais disponíveis na Biblioteca da Universidade de São Paulo (USP).

Aos Drs. **Antonio José Lapa e José Carlos Verle Rodrigues** pela contribuição sobre informações importantes sobre a andiroba.

À Dra. **Lucille Marilyn May Kriger d’Amorim Antony** pela orientação e revisão dos textos para a língua inglesa e leitura crítica do trabalho.

À Dra. **Vivien Priscilla Ann Kriger d’Amorim Antony** pela revisão ortográfica e gramatical dos textos na língua portuguesa.

À **Universidade Federal do Amazonas**, em especial aos **professores do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML)** – Dr. **Jeconias Câmara** e Dr. **Luiz Carlos de Lima Ferreira**, por contribuírem com a realização desse projeto.

À **Fundação de Medicina Tropical – AM – Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Bührnheim”** representada pelo **Dr. Jorge Luiz López-Lozano**, pela disponibilização dos animais e dos laboratórios para a realização desta pesquisa, bem como a **Maria das Dores Nogueira Noronha, Emiro Gnutzmann Muniz, Itamar Marques de Souza, Bruno Melo Medeiros e Thiago Ferreira de Araújo**, pelo auxílio durante os experimentos.

À **Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM) – Laboratório de Anatomia Patológica** representada pelo **Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira**, pela contribuição com a análise e fotografias dos cortes histopatológicos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM)**, por ter contribuído como agente financiador em parte desta pesquisa.

Aos funcionários e amigos do **Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) – UFAM**, especialmente a **Maria de Fátima Barbosa, Creuzimar Barros Santos Soares da Silva, Cleuton da Costa Borborema, Leila Lima dos Santos e Glaucinete Mateus Ávila** pelo incentivo e auxílio na preparação dos materiais e reagentes utilizados na realização dos procedimentos histopatológicos.

A **todos os professores do curso de Mestrado** o meu *muito obrigado* por enriquecerem meus conhecimentos e contribuírem para o meu aprimoramento profissional, em especial a Dra. **Julia Ignez Salem**, pelos “puxões de orelha”.

Aos funcionários e amigos do Mestrado **Lídia de Fátima dos Santos Pereira, Rafaela Cristina Fernandes Pinheiro, Ronaldo Pontes Ferreira e Randiza Santis Lopes**, pelo companheirismo e colaboração ao longo de todo o curso.

Aos meus **colegas de Mestrado**, pelo companheirismo e incentivo demonstrados, especialmente aos meus amigos **Francisco Duarte e Socorro Viga** pelas trocas recíprocas de colaboração e paciência nos momentos de dificuldade.

À amiga **Claudia Helena da Silveira Pio**, pelo incentivo e contribuição com as fotografias dos experimentos e da *Carapa guianensis*.

Às amigas **Miharu M. Matsuura Matos, Julivalda de Carvalho Alecrim Ribeiro, Myuki Alfaia Esashika Crispim, Júnia Raquel Dutra Ferreira, Rita de Cássia Barreto dos Santos**, pelo incentivo e apoio.

Aos amigos **Andreza Pereira Mendonça e André Luiz de Menezes**, por contribuírem com preciosas informações sobre a andiroba.

Ao amigo **Felicien Gonçalves Vásquez** pela colaboração com o tratamento estatístico dos dados.

À amiga **Gláucia Regina Pinheiro de Lima** pelo auxílio na elaboração da ficha catalográfica.

Às minhas “chefinhas” imediatas Dra. **Maria das Graça Soares de Souza Villela** e Dra. **Cacilda Satomi Yano Mallmann**, pela liberação parcial das minhas atividades.

A todos os meus colegas de trabalho que tiveram que se sacrificar durante minha ausência, em especial para **Agláé Caliri, Mariluce Cintra, Raimundo Pereira, Swamy Gama, Raylson Quaresma, Socorro Lagarto, Paula Ângela, Valter Silva, Nilzete Faria, Débora Oliveira, Vânia Fernandes, Márcia Coelho, Andréa Roberto, Ilza Paixão** e tantos outros não mencionados.

A **todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste projeto de dissertação de Mestrado**, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Na Amazônia, os acidentes por serpentes peçonhentas constituem sério problema de saúde pública. A soroterapia neutraliza os efeitos sistêmicos do veneno, mas não os efeitos locais; portanto, são necessárias pesquisas sobre inibidores naturais dos efeitos locais do envenenamento. A andiroba (*Carapa guianensis* Aublet, 1775) é uma planta de florestas tropicais e equatoriais, cujas sementes fornecem um óleo com propriedades medicinais, com atividades antiinflamatória, cicatrizante e anti-séptica, além de ser um ótimo repelente. Com o objetivo de avaliar a atividade do óleo de andiroba na inflamação local induzida por venenos de serpentes amazônicas, foram estudados experimentalmente os efeitos farmacológicos gerais do óleo de andiroba e sua atividade sobre o processo inflamatório local, induzido em camundongos pelos venenos de serpentes *Bothrops atrox* ou *Crotalus durissus ruruima*, serpentes de importância epidemiológica na região da Amazônia. A cinética inibitória do edema em camundongos foi avaliada pela medição do diâmetro do edema das patas dos camundongos e por métodos histopatológicos. Após o tratamento com o óleo de andiroba, obteve-se uma inibição significativa no infiltrado inflamatório de 87,03% e 82,10%, às 3 e 12 horas respectivamente, nas patas experimentais induzidas com o veneno de *Bothrops atrox*. Com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* a inibição atingiu 89,37% e 75,60%, às 3 e 6 horas, respectivamente, pós-tratamento. Quanto ao edema avaliado pela medição do diâmetro das patas dos camundongos, foi observada uma diminuição significativa em 37,67% no edema induzido pelo veneno de *Bothrops atrox* e em 42,41% no edema induzido pelo veneno de *Crotalus durissus ruruima*, a partir da primeira hora após a administração desses venenos nos grupos tratados com o óleo de andiroba. A redução dos edemas progrediu até 50,64% (para *Bothrops atrox*) e 82,37% (para *Crotalus durissus ruruima*) às 3 horas pós-tratamento. Histologicamente observou-se uma redução no edema induzido por *Bothrops atrox* de 29,18% às 3 horas pós-tratamento. Com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* a redução do edema foi de 30,87% às 3 horas pós-tratamento. Nem a hemorragia e nem a mionecrose foram inibidas significativamente pela administração do óleo de andiroba por via intraperitoneal. Sugere-se que a atividade inibitória da *Carapa guianensis* poderia estar relacionada à diminuição da migração leucocitária.

**Palavras-chave:** Acidentes por serpentes peçonhentas; andiroba; inflamação local; venenos de serpentes; *Bothrops atrox*; *Crotalus durissus ruruima*, *Carapa guianensis*.

## ABSTRACT

In the Amazon the accidents caused by venomous snakes represent a serious public health problem. Serotherapy neutralizes the systemic effects from the venoms, but not local effects; therefore, there is need for research on natural inhibitors of the local effects from snake envenomation. Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet, 1775) is a plant from tropical and equatorial forests and its seeds produce an oil which has medicinal properties, with anti-inflammatory and antiseptic activities, and wound healing properties, besides being a fine repellent. With the objective of evaluating the activity of the andiroba oil on the local inflammation induced by Amazonian snakes, an experimental study was done on the general pharmacological effects of the andiroba oil and on the inflammatory process induced in mice by the venoms of *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus ruruima*, two snakes species of epidemiological importance in the Amazon region. The inhibitory kinetics of the edema in mice was evaluated by measuring the paw edema diameter and by histopathological methods. There was a significant inhibition in the inflammatory infiltrate of 87,03% and 82,10% after 3 and 12 hours respectively, after treating with andiroba oil the paws induced with the venom of *Bothrops atrox*. With the venom of *Crotalus durissus ruruima* inhibition reached 89,37% and 75,60% after 3 and 6 hours respectively, after treatment with andiroba oil. There was significant reduction in the kinetics of the edema induced by the venom of *Bothrops atrox* (37,67%) and of *Crotalus durissus ruruima* (42,41%) as early as the first hour of treatment with andiroba oil. This reduction progressed to 50,64% (for *Bothrops atrox*) and 82,37% (*Crotalus durissus ruruima*) after three hours after treatment. Histologically, it was observed a reduction of the edema induced by *Bothrops atrox* venom by 29,18% after 3 hours. With the venom of *Crotalus durissus ruruima* the reduction of the edema was 30,87% after 3 hours. Neither haemorrhagy nor myonecrosis were reduced or inhibited by andiroba oil administrated intraperitoneally. It is suggested that the inhibitory activity of *Carapa guianensis* could be related to leucocitary migration reduction.

**Keywords:** Accidents caused by poisonous snakes; andiroba; local inflammation; snake venoms; *Bothrops atrox*; *Crotalus durissus ruruima*; *Carapa guianensis*.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividade inibitória do óleo de andiroba (150 µL via i.p.) sobre o edema de pata induzido pelos venenos de <i>Bothrops atrox</i> e <i>Crotalus durissus ruruima</i>	53
Tabela 2	Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas experimentais dos camundongos, induzidas com o veneno de <i>Bothrops atrox</i> , 3 horas após a injeção do veneno	58
Tabela 3	Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas controle dos camundongos, induzidas com solução salina (NaCl 0,9%), 3 horas após a injeção do veneno	58
Tabela 4	Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas experimentais dos camundongos, induzidas com o veneno de <i>Bothrops atrox</i> , 12 horas após a injeção do veneno	60
Tabela 5	Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas controle dos camundongos, induzidas com solução salina (NaCl 0,9%), 12 horas após a injeção do veneno	60
Tabela 6	Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas experimentais dos camundongos, induzidas com o veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> , 3 horas após a injeção do veneno	62
Tabela 7	Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas controle dos camundongos, induzidas com solução salina (NaCl 0,9%), 3 horas após a injeção do veneno	62
Tabela 8	Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas experimentais dos camundongos, induzidas com o veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> , 6 horas após a injeção do veneno	64
Tabela 9	Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas controle dos camundongos, induzidas com solução salina (NaCl 0,9%), 6 horas após a injeção do veneno	64

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Plantas com atividades antiofídicas	29
Quadro 2	Composição química do óleo de andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> Aublet, 1775)	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Serpente <i>Bothrops atrox</i>	18
Figura 2	Serpente <i>Crotalus durissus ruruima</i>	18
Figura 3	<i>Carapa guianensis</i> Aublet, 1775	32
Figura 4	Sementes de <i>Carapa guianensis</i> Aublet, 1775	32
Figura 5	Estruturas químicas dos principais tetranortriterpenóides (TNTP) isolados das sementes da <i>Carapa guianensis</i> Aublet, 1775	36
Figura 6	Administração do óleo de andiroba	43
Figura 7	Administração dos venenos	44
Figura 8	Efeito do óleo de andiroba sobre a cinética da atividade edematogênica do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	54
Figura 9	Efeito do óleo de andiroba sobre a cinética da atividade edematogênica do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	55
Figura 10	Edema de pata induzido pelo veneno de <i>Bothrops atrox</i>	56
Figura 11	Edema de pata induzido pelo veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	56
Figura 12	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo injetado com solução salina (NaCl 0,9%) – Face dorsal normal	65
Figura 13	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo injetado com solução salina (NaCl 0,9%) – Face ventral normal	65
Figura 14	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de <i>Bothrops atrox</i> (5 µg) – Grupo CONTROLE. Edema acentuado e hemorragia acentuada	66
Figura 15	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de <i>Bothrops atrox</i> (5 µg) – Grupo CONTROLE. Infiltrado inflamatório moderado, edema moderado e hemorragia acentuada	66
Figura 16	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de <i>Bothrops atrox</i> (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto e edema acentuado	67
Figura 17	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de <i>Bothrops atrox</i> (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório moderado, edema moderado e hemorragia acentuada	67
Figura 18	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de <i>Bothrops atrox</i> (5 µg) – Grupo CONTROLE. <i>Bothrops atrox</i> . Infiltrado inflamatório acentuado, congestão e hemorragia	68
Figura 19	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de <i>Bothrops atrox</i> (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto e edema moderado	68
Figura 20	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de <i>Bothrops atrox</i> (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto, edema discreto, hemorragia endomisial acentuada e miocitólise moderada	69
Figura 21	Corte transversal do coxim plantar da pata esquerda do camundongo, 3 horas após injeção com solução salina (NaCl 0,9%) – Grupo CONTROLE. Músculo sem edema e sem hemorragia	70

Figura 22	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 12 horas após injeção com o veneno <i>Bothrops atrox</i> (5µg) – Grupo CONTROLE. Edema discreto	71
Figura 23	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 12 horas após injeção com o veneno <i>Bothrops atrox</i> (5µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Edema discreto e hemorragia acentuada (difusa)	71
Figura 24	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 12 horas após injeção com o veneno <i>Bothrops atrox</i> (5µg) – Grupo CONTROLE. Infiltrado inflamatório intramuscular moderado, edema moderado, hemorragia discreta e miocitólise moderada	72
Figura 25	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 12 horas após injeção com o veneno <i>Bothrops atrox</i> (5µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto, edema discreto, hemorragia endomisial acentuada e miocitólise moderada	72
Figura 26	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 12 horas após injeção com o veneno <i>Bothrops atrox</i> (5µg) – Grupo CONTROLE. Infiltrado leucocitário acentuado, edema acentuado e hemorragia discreta	73
Figura 27	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> (5 µg) – Grupo CONTROLE. Infiltrado inflamatório discreto, edema moderado	74
Figura 28	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto, edema discreto	74
Figura 29	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 6 horas após injeção com o veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> (5 µg) – Grupo CONTROLE. Infiltrado inflamatório discreto; edema discreto; ausência de hemorragia; miocitólise discreta	75
Figura 30	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 6 horas após injeção com o veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto; edema moderado; ausência de hemorragia; miocitólise acentuada com vacuolização das fibras musculares	75
Figura 31	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 6 horas após injeção com o veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> (5 µg) – Grupo CONTROLE. Infiltrado inflamatório moderado; edema moderado; ausência de hemorragia; miocitólise moderada	76
Figura 32	Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 6 horas após injeção com o veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto; edema discreto; ausência de hemorragia; miocitólise discreta	76
Figura 33	Corte transversal do coxim plantar da pata esquerda do camundongo, 3 horas após injeção com solução salina (NaCl 0,9%) – Grupo CONTROLE. Ausência de infiltrado inflamatório, edema, hemorragia e miocitólise	77
Figura 34	Corte transversal do coxim plantar da pata esquerda do camundongo, 6 horas após injeção com solução salina (NaCl 0,9%) – Grupo EXPERIMENTAL. Ausência de infiltrado inflamatório, edema, hemorragia e miocitólise	77
Figura 35	Prováveis locais de atuação dos compostos do óleo de andiroba no processo inflamatório local induzidos pelos venenos de serpentes da família Viperidae	87
Figura 36	Processo tradicional de extração do óleo de andiroba	106

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$\beta$	Beta
DL <sub>50</sub>	Dose Letal 50%
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
EM	Espectrometria de Massa
FAPEAM	Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado do Amazonas
FMTAM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
$\gamma$	gama
g	grama
°C	graus Celsius
h	hora(s)
HE	Coloração histológica padrão de Hematoxilina-Eosina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
=	igual a
IL	Interleucina
i.m.	via intramuscular
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
i.p.	via intraperitoneal
i.pl.	via intraplantar
IV	infravermelho
$\kappa$	kappa
kg	quilograma
$\pm$	mais ou menos
m <sup>3</sup>	metros cúbicos
$\mu$	micra
$\mu$ g	micrograma
$\mu$ L	microlitros
mL	mililitros
min	minuto(s)
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipases A <sub>2</sub>
PMN	Polimorfonucleares
RMN	Ressonância Magnética
q.s.p.	quantidade suficiente para
TNTP	tetranortriterpenóides
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UV	ultravioleta
v.o.	via oral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.1	Venenos Ofídicos	19
1.2	Inflamação Local Induzida por Serpentes Peçonhentas	25
1.3	Plantas com Atividade contra Venenos de Serpentes Peçonhentas	28
1.4	A Andiroba	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	37
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	38
3.1	Modelo de Estudo	38
3.2	Universo de Estudo	38
3.3	Procedimentos	40
3.4	Análise Estatística	49
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	50
4.1	Avaliação dos Efeitos Farmacológicos Gerais do Óleo de Andiroba	50
4.2	Efeito do Óleo de Andiroba sobre a Atividade Edematogênica dos Venenos das Serpentes	53
4.3	Análise Histopatológica	57
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	88
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	89
	<b>APÊNDICES</b>	99
	<b>ANEXO</b>	106

## 1 INTRODUÇÃO

As serpentes peçonhentas produzem seus venenos por meio de glândulas especializadas, capazes de sintetizar e secretar uma mistura complexa de substâncias biologicamente ativas, compostas principalmente por proteínas e peptídeos. Estes venenos são produzidos com a finalidade de paralisar e/ou matar e iniciar a digestão da presa, mas também servem como mecanismos de defesa (BOLAÑOS, 1984).

Em humanos, os envenenamentos por serpentes peçonhentas constituem problema de saúde pública por sua frequência e gravidade, especialmente em países de clima tropical onde as condições climáticas favorecem as atividades rurais o ano inteiro e, portanto, expondo maior número de pessoas a acidentes ofídicos (BRASIL, 1998a). Além disto, há falta ou dificuldade de acesso a recursos terapêuticos adequados (BOLAÑOS, 1984). Em muitos casos, há a agravante de que tais acidentes ocorrem em áreas desprovidas de assistência médica de qualquer natureza.

No Brasil, as serpentes peçonhentas de interesse médico pertencem a duas principais famílias: a família Elapidae, subfamília Elapinae, que tem como principal gênero *Micrurus* Wagler, 1824; e a família Viperidae, subfamília Crotalinae, da qual destacam-se quatro gêneros: *Bothrops* Wagler, 1824; *Bothrocophias* Gutberlet e Campbell, 2001; *Crotalus* Linnaeus, 1758 e *Lachesis* Daudin, 1803 (HOGE; ROMANO-HOGE, 1978/79; CAMPBELL; LAMAR, 1989; WÜSTER, 2003).

A epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil apresenta um perfil que se mantém inalterado ao longo dos últimos cem anos. Na Amazônia os acidentes ofídicos geralmente ocorrem com maior frequência no início e no final do ano, em indivíduos do sexo masculino, em trabalhadores rurais, na faixa etária produtiva de 15 a 49 anos; atingem principalmente os membros inferiores e a maioria deve-se ao gênero *Bothrops* (BRASIL, 1998a; BOCHNER; STRUCHINER, 2003). Perfil semelhante tem sido encontrado no estado do Amazonas (BORGES *et al.*, 1999; SOUZA, 2001). Dados do Ministério da Saúde mostram que cerca de 90,5% dos casos notificados no Brasil são atribuídos às serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*; 7,7% ao gênero *Crotalus*; 1,4% ao gênero *Lachesis* e 0,4% provocado pelo gênero *Micrurus*. No período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, foi notificada no Brasil uma média de 20.000 casos/ano, com letalidade geral em torno de 0,45%. O acidente crotálico teve a pior evolução, apresentando o maior índice de letalidade, onde dos 5.072 casos, 95 foram a óbito (1,87%) (BRASIL, 1998a). Ao longo desses anos, houve discreto aumento nas notificações dos gêneros *Crotalus* (9,0%), *Lachesis* (2,5%) e *Micrurus* (0,5%), permanecendo o predomínio dos acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* (88,0%) (BRASIL, 2005).

O gênero *Bothrops* é encontrado nas Américas Central e do Sul. No Brasil distribui-se em todo o país, tendo como principal causador em cada região as seguintes espécies: *Bothrops atrox* (Norte), *Bothrops erythromelas* e *Bothrops leucurus* (Nordeste), *Bothrops jararaca* (Sul/Sudeste) e *Bothrops moojeni* (Centro-Oeste) (CARDOSO, 1990; BRASIL, 1998a; MELGAREJO, 2003).

O gênero *Crotalus* distribui-se por todas as Américas, desde o México até a Argentina, habitando preferencialmente regiões secas e áridas. No Brasil, a principal espécie é *Crotalus durissus*, apresentando sete subespécies: *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. terrificus* e *C. d. trigonicus* (HOGE; ROMANO-HOGE, 1978/1979; CAMPBELL; LAMAR, 1989).

No Estado do Amazonas têm sido registrados acidentes ofídicos causados por espécimes de *Bothrops atrox* (jararaca, surucucurana), *Bothrops brazili* (jararaca), *Lachesis muta muta* (surucucu) e pelas corais *Micrurus hemprichii*, *Micrurus lemniscatus*, *Micrurus spixii* e *Micrurus surinamensis*. Em Manaus, entre 1974 e 1999, foram atendidos na Fundação de Medicina Tropical (FMTAM) 2.636 acidentes ofídicos, dos quais mais de 90% foram ocasionados por espécimes de *Bothrops atrox* (Figura 1). Os acidentes aumentam no período de maior pluviosidade (novembro a maio), com alto índice na cheia dos rios (IMTM, 1995). No Estado de Roraima, o gênero *Crotalus* responde por cerca de 14% dos acidentes ofídicos confirmados, causados pela subespécie *Crotalus durissus ruruima* (Figura 2) (NASCIMENTO, 2000).

Por causarem dano tecidual de forma muito rápida, os envenenamentos por serpentes peçonhentas da família Viperidae tendem a propiciar complicações graves, como infecções secundárias locais, necrose e síndrome compartimental, que podem levar à amputação do membro atingido ou evoluir para a morte do paciente (OTERO *et al.*, 2002; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

A soroterapia específica é o tratamento indicado nos acidentes ofídicos; entretanto, demonstra ser mais efetiva na neutralização das complicações sistêmicas, o mesmo não ocorrendo sobre os efeitos locais dos envenenamentos, provavelmente devido à rapidez com que esses efeitos se instalam e à baixa concentração do antiveneno no tecido (GUTIÉRREZ *et al.*, 1998; LEÓN *et al.*, 2000).

Na Amazônia, os acidentes por serpentes peçonhentas que ocorrem em locais distantes dos centros que possuem o antiveneno levam à demora no atendimento desses pacientes, podendo agravar seus efeitos locais. Embora a soroterapia seja imprescindível para a neutralização dos efeitos sistêmicos dos venenos, são necessárias pesquisas sobre inibidores naturais que possam neutralizar os efeitos locais do envenenamento ofídico.

O óleo da andiroba (*Carapa guianensis*, Aublet 1775) é bastante utilizado na medicina popular em nossa região, por suas atividades antiinflamatória, cicatrizante e anti-séptica, além de atuar como ótimo repelente para insetos, sendo facilmente encontrado em mercados e feiras livres.

A avaliação da atividade do óleo de andiroba sobre o processo inflamatório local, induzido em camundongos por venenos de serpentes peçonhentas, poderá contribuir para o aproveitamento racional de espécies amazônicas na busca de fármacos antiofídicos, fornecendo subsídios para o conhecimento das potencialidades medicinais das plantas amazônicas, visando futura aplicação biotecnológica.



Figura 1 – Serpente *Bothrops atrox*.  
FONTE: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)



Figura 2 – Serpente *Crotalus durissus ruruima*.  
FONTE: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)

## 1.1 Venenos Ofídicos

De um modo geral, os venenos das serpentes peçonhentas são misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos. Mais de 90% do peso seco do veneno são constituídos por proteínas e peptídeos, compreendendo muitas enzimas, proteínas tóxicas sem atividade enzimática e proteínas não tóxicas, que podem ser classificadas como: hemorraginas; enzimas com atividade proteolítica, neurotóxica, cardiotoxica; fatores ativadores/inibidores do sistema de coagulação sanguínea; inibidores de enzimas; citotoxinas; fatores de crescimento dos nervos (NGF); fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) miotóxicas; fatores liberadores de peptídeos vasoativos e fatores hemolíticos (CHIPPAUX; GOYFFON, 1998; MARKLAND, 1998).

Existe variabilidade na composição química e nas atividades biológicas (anticoagulantes, hemorrágicas, necrosantes, miotóxicas, neurotóxicas, hemolíticas, cardiotoxicas e citotóxicas) dos venenos de serpentes de espécies diferentes do mesmo gênero, ou dos indivíduos de uma mesma espécie, provenientes de diferentes regiões e/ou durante o desenvolvimento ontogenético (ARAGÓN; GUBENSÉK, 1981; LÓPEZ-LOZANO *et al.*, 2002). Estas diferenças na composição molecular dos venenos das serpentes poderiam induzir sintomas clinicamente não observados, portanto condicionando a uma soroterapia inadequada (GUTIÉRREZ *et al.*, 1980; SALDARRIAGA *et al.*, 2003).

A soroterapia permanece como o único tratamento eficaz nos acidentes provocados por serpentes peçonhentas. Os antivenenos são produzidos pela imunização de cavalos, utilizando como antígenos os venenos de serpentes de mesmo gênero (soros antibotrópico, anticrotálico ou antielapídico) ou misturas de venenos de diferentes gêneros (soro antiofídico botrópico-laquetico ou botrópico-crotálico). A dose do antiveneno depende do tipo de serpente e da quantidade de veneno injetado, bem como do estado clínico do paciente e da evolução de seus sintomas (CHIPPAUX; GOYFFON, 1998).

Embora a soroterapia seja eficaz no tratamento dos acidentes por serpentes peçonhentas, por tratar-se de imunoglobulinas heterólogas de origem eqüina, pode levar a um processo de hipersensibilidade, como a indução de choque anafilático. Portanto, a aplicação da soroterapia deve ser sempre acompanhada por médico especializado (FRANÇA; FAN, 1992; BRASIL, 1998a).

Quando a soroterapia específica é aplicada, o antiveneno neutraliza de forma eficiente os efeitos sistêmicos produzidos pelas toxinas dos venenos de serpentes. Entretanto, os efeitos locais não são eficientemente neutralizados (FRANÇA; FAN, 1992; BRASIL, 1998a).

### **1.1.1 Venenos Botrópicos**

Os venenos botrópicos apresentam três principais atividades biológicas: inflamatória, coagulante e hemorrágica.

A atividade inflamatória é induzida por um conjunto de toxinas, destacando-se dentre elas as metaloproteinases, fosfolipases, esterases, cininogenases, calicreínas e lectinas. Essas toxinas produzem lesões locais, onde são observados rubor, edema, bolhas e necrose; apresentam também atividade inflamatória indireta, podendo induzir ou liberar potentes autacóides (bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, histamina e serotonina, interleucinas, fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) que causam lesão capilar, levando ao surgimento de petéquias, hematúria, epistaxe, hematêmese e hemorragia visceral (ROSENFELD, 1971; FRANÇA; FAN, 1992; LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2003). Algumas das principais miotoxinas isoladas e identificadas da espécie *Bothrops atrox* foram *Ba-K49* (MARAGANORE *et al.*, 1984), *BaPLA<sub>2</sub>-I* e *BaPLA<sub>2</sub>-III* (KANASHIRO *et al.*, 2002; NÚÑEZ *et al.*, 2004), e *Bam-PLA2-II* (LÓPEZ-LOZANO, 2002a).

A atividade coagulante deve-se à capacidade destes venenos em ativar os fatores da coagulação sanguínea – por ação do tipo trombina – levando ao consumo de fibrinogênio e à formação de fibrina intravascular; conseqüentemente há o consumo dos fatores da coagulação produzindo, portanto, a incoagulabilidade sanguínea. As toxinas dos venenos botrópicos que apresentam esse tipo de ação ativam a cascata de coagulação de modo diferente dos fatores fisiológicos, não sendo neutralizados pela heparina (ROSENFELD, 1971; FRANÇA; FAN, 1992; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

A atividade hemorrágica está relacionada à presença de hemorraginas. Estas hemorraginas são metaloproteinases zinco-dependentes que agem sobre os vasos capilares, ocasionando lesão da membrana basal do endotélio vascular, provavelmente pela digestão enzimática da lâmina basal da microvasculatura e ruptura completa das células endoteliais. Com a permeabilidade vascular alterada, as células endoteliais rompem-se, produzindo assim a hemorragia local ou sistêmica. As hemorraginas atuam por intermédio de dois principais mecanismos. Podem produzir a hemorragia *per rhexis*, caracterizada por alterações marcantes nas células endoteliais com a formação de “gaps”, por onde ocorre o extravasamento das células, ou podem produzir a hemorragia *per diapedesis*, caracterizada pela dilatação das junções intercelulares das células endoteliais em conseqüência da reação inflamatória desencadeada pelas hemorraginas (GUTIÉRREZ; CHAVES, 1980; 1995; KAMITGUTI *et al.*, 1996; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2005).

Os efeitos causados pelos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* podem ser classificados clinicamente, de acordo com suas manifestações locais e sistêmicas. No local da picada, a inoculação do veneno ocorre pelas vias subcutânea ou intramuscular, com a marca das presas ou somente arranhões visíveis. Frequentemente observa-se sangramento no local de inoculação, porém sua presença nem sempre indica comprometimento sistêmico. Há

formação precoce do edema, geralmente acompanhado de equimose e dor; com o passar do tempo, o edema pode estender-se por todo o membro afetado, devido ao extravasamento de líquido para o espaço extravascular. Podem ocorrer linfadenomegalia regional e formação de bolhas de conteúdo seroso, hemorrágico ou necrótico, que podem evoluir para complicações infecciosas (FRANÇA; FAN, 1992; BRASIL, 1998a; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

Dentre as complicações locais destacam-se infecções locais, necrose e síndrome compartimental. As infecções locais incluem abscesso, celulite e erisipela; o maior risco de abscesso está relacionado ao maior tempo entre o acidente e a soroterapia. Geralmente limitada ao tecido subcutâneo, a necrose também pode comprometer tendões, músculos e ossos. Devido ao processo inflamatório e a hemorragia que se desenvolvem na região da picada, os acidentes botrópicos tendem a propiciar a síndrome compartimental, isto é, o aumento da pressão interna de um compartimento fechado por onde transcorrem músculos, vasos e nervos, os quais interferem na circulação sanguínea da região afetada (BRASIL, 1998a; FRANÇA; FAN, 1992; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

O uso de torniquete e a demora no início da soroterapia são fatores que contribuem para o aumento na intensidade e extensão da necrose. Cortes, escarificações, sucção ou garroteamento, usados para tentar extrair o veneno, podem provocar uma acentuação do edema e lesões cutâneas mais graves (FRANÇA; FAN, 1992; BRASIL, 1998a; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

Nos acidentes botrópicos a principal complicação sistêmica é a insuficiência renal aguda (IRA), que normalmente é decorrente de outras manifestações, como coagulação intravascular disseminada (CIVD), hipotensão, hemólise, hipersensibilidade a proteínas do antiveneno, septicemia e uso de antibióticos (BRASIL, 1998a; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

### 1.1.2 Venenos Crotálicos

Os venenos crotálicos apresentam as principais atividades biológicas: neurotóxica, miotóxica, coagulante, inflamatória e hemorrágica.

A atividade neurotóxica deve-se principalmente a *crotoxina*, uma neurotoxina pré-sináptica que age sobre as terminações nervosas motoras, inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos e levando ao bloqueio neuromuscular e às paralisias motoras e respiratórias. Além da *crotoxina*, outras neurotoxinas foram isoladas dos venenos crotálicos: *crotamina*, *giroxina* e *convulxina*; entretanto, seus efeitos tóxicos ainda não foram detectados nos envenenamentos em humanos (CARDOSO, 1990; GUTIÉRREZ; CHAVES, 1980; 1995; BRASIL, 1998a; AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003).

A ação miotóxica ocasiona a rabdomiólise sistêmica, com a liberação de enzimas musculares e mioglobina na circulação. Tanto a *crotoxina* como a *crotamina* possuem a capacidade de produzir lesões no tecido muscular esquelético, mesmo em tecidos musculares distantes do local da picada. Estudos histopatológicos mostram que as fibras musculares apresentam-se com focos necróticos esparsos, dependendo da intensidade da lesão, misturados a fibras aparentemente normais (GUTIÉRREZ; CHAVES, 1980; 1995; AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003).

A atividade coagulante está relacionada à presença de enzimas do tipo trombina, levando a alterações na coagulação sanguínea. Há o consumo de fibrinogênio, além do fator V e da alfa-2-antiplasmina, com aumento dos produtos de degradação da fibrina (PDF) e fibrinogênio, com possível afibrinogenemia e incoagulabilidade sanguínea, mas sem alteração do número de plaquetas (GUTIÉRREZ; CHAVES, 1980; 1995; AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003).

A atividade inflamatória local é pouco intensa, caracterizada por edema e eritema discretos, podendo haver hemorragia e necrose (GUTIÉRREZ; CHAVES, 1980; OWNBY *et al.*, 1984; MINTON; WEINSTEIN, 1986).

Alguns venenos de *Crotalus durissus*, como a subespécie *Crotalus durissus ruruima*, apresentam atividade hemorrágica e proteolítica (DOS-SANTOS *et al.*, 1993; MUNIZ, 2002). A atividade hemorrágica deve-se à presença de hemorraginas, que são metaloproteinases zinco-dependentes (GUTIÉRREZ *et al.*, 1985).

Experimentalmente, tem sido observado que a injeção via intramuscular das crotoxinas do veneno da subespécie *Crotalus durissus ruruima* induzem mionecrose, necrose coagulativa, homogeneização e acidofilia, perda das estriações transversais, miólise, edema intersticial, congestão e infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares neutrófilos (DOS SANTOS, 1993).

Clinicamente, os efeitos locais levam a formação de edema e eritema no local da picada, e a dor é inexistente ou pouco intensa (BRASIL, 1998a; FRANÇA; FAN, 1992; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

Sintomas relacionados à atividade neurotóxica levam ao aparecimento da “fácies miastênica”, que se manifesta pela ptose palpebral e flacidez na musculatura da face. Pode vir acompanhada de oftalmoplegia, visão turva ou diplopia, além de midríase. Dores musculares generalizadas e rabdomiólise relacionam-se à atividade miotóxica. A rabdomiólise está relacionada à gravidade do acidente e é acompanhada por mioglobinúria. Sintomas gerais podem estar presentes, como mal-estar, náuseas, cefaléia, prostração e sonolência (BRASIL, 1998a; FRANÇA; FAN, 1992; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

As principais complicações sistêmicas são: insuficiência renal aguda (IRA), freqüente nos casos graves tratados tardiamente ou de modo inadequado, e a insuficiência respiratória aguda secundária à paralisia muscular (AMARAL *et al.*, 1991).

## 1.2 Inflamação Local Induzida Por Serpentes Peçonhentas

A inflamação é a reação dos tecidos a um dano tecidual. É uma resposta protetora local ou sistêmica que determina o estágio de cura e a reconstituição da função normal quanto ao dano tecidual, independentemente da causa. Este processo envolve alterações funcionais da microcirculação, levando ao acúmulo de fluidos e leucócitos nos tecidos extravasculares, e à dor local (DENNIS, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005).

Os processos da inflamação em nível celular envolvem quatro etapas principais: mudanças funcionais nas células dos músculos lisos, que causam vasodilatação com mudanças no fluxo sanguíneo; contração citoesquelética nas células endoteliais causando alterações na permeabilidade vascular; migração dos leucócitos fagocíticos para o local da inflamação; e fagocitose (JAIN *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005).

Moléculas do tipo mediadoras, inibidoras e reguladoras são as principais moléculas que participam no processo inflamatório. Os eventos celulares pró-inflamatórios iniciam-se por moléculas produzidas por mediadores químicos sistêmicos, tais como prostaglandinas e sistema complemento. Substâncias inibitórias tais como os inibidores de proteases podem bloquear os próprios mediadores sistêmicos ou inibir moléculas pró-inflamatórias, como as proteinases. Moléculas regulatórias são produzidas no sítio da inflamação, a fim de modificar a função celular, ou podem ser produzidas em locais distantes deste sítio (JAIN *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

A reação inflamatória local é um importante componente clínico dos envenenamentos por serpentes peçonhentas, especialmente das serpentes da família Viperidae (*Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*). Os envenenamentos por estes tipos de serpentes promovem proeminente dano tecidual local, caracterizado por edema, dor, hemorragia e necrose, além de alterações na coagulação sanguínea e efeitos neurotóxicos sistêmicos. Clinicamente destaca-se o edema,

pois promove a perda de fluidos e compromete tecidos, podendo evoluir para necrose e/ou síndrome compartimental. Em muitos casos deixa seqüelas físicas ou é necessária a amputação do membro atingido. Além disso, os efeitos locais não são facilmente neutralizados pela soroterapia específica (ROSENFELD, 1971; BJARNASON e FOX, 1994; FERREIRA *et al.*, 1992; RUSSELL *et al.*, 1997; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2003).

Nos acidentes botrópicos, a reação inflamatória ocorre imediatamente após a inoculação do veneno, promovendo marcante dano tecidual local devido à ação de componentes do veneno e/ou pela produção de mediadores endógenos (histamina, serotonina, eicosanóides, fator ativador de plaquetas e receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ). Esses mediadores são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos e ativação ou dano das células endoteliais nos locais onde houve o extravasamento dos leucócitos (CHAVES *et al.*, 1995; CARNEIRO *et al.*, 2002).

Os tecidos lesados pelos constituintes dos venenos são rapidamente infiltrados por leucócitos. Nas primeiras horas há o predomínio de neutrófilos, sendo gradativamente substituídos por células mononucleares, monócitos e linfócitos (FARSKY *et al.*, 1997).

Os acidentes produzidos espécies do gênero *Bothrops* induzem danos teciduais locais devido à presença de proteases, hemorraginas, fosfolipases, bem como a liberação de mediadores endógenos, como a bradicinina e a serotonina (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; BRASIL, 1998a).

O veneno de *Crotalus durissus* induz uma inflamação local não tão intensa como nos acidentes botrópicos, com presença de edema e eritema discretos, além de hemorragia e necrose (GUTIÉRREZ; CHAVES, 1980; 1995).

A necrose local deve-se em parte à atividade miotóxica direta induzida pelas miotoxinas, à ação coagulante por trombose vascular e à ação hemorrágica por destruição vascular induzida por hemorraginas. As miotoxinas atuam desestabilizando a estrutura fosfolipídica ao ligar-se ao sarcolema, alterando sua permeabilidade para íons e macromoléculas (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; BENVENUTI, 2003).

As hemorraginas, ao contrário, são capazes de degradar os componentes da membrana basal celular e a matriz extracelular ao redor de vênulas e capilares, com a desintegração da estrutura vascular (BARAMOVA *et al.*, 1989; BJARNASON; FOX, 1994; MARUYAMA *et al.*, 1992; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Além disso, podem também causar necrose local pela ativação do TNF- $\alpha$  (MOURA DA SILVA *et al.*, 1996).

A neutralização dos efeitos locais pela soroterapia não é completa, devido à complexidade dos constituintes dos venenos de serpentes, assim como pela rápida instalação das alterações locais, que incluem edema, dor, hemorragia e necrose. Além disso, devem ser considerados os mediadores endógenos que são liberados durante a inflamação (ROSENFELD, 1971; FRANÇA; FAN, 1992; RUSSEL *et al.*, 1997; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

### 1.3 Plantas com Atividade Contra Venenos de Serpentes Peçonhentas

O uso de plantas medicinais na tentativa de neutralizar os efeitos tóxicos dos venenos de serpentes peçonhentas é uma prática muito antiga (BOLAÑOS, 1984).

Em muitas regiões do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, procura-se um tratamento alternativo à soroterapia e de baixo custo. Na medicina folclórica atribui-se a diversas plantas o poder de atuarem como antídotos contra picadas de serpentes peçonhentas (DINIZ, 1987; MARTZ, 1992; SELVANAYAGAM *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1999; MORS *et al.*, 2000; OTERO *et al.*, 2000).

Os extratos de plantas medicinais são fontes ricas de inibidores naturais e compostos farmacologicamente ativos, que parecem antagonizar as atividades de alguns venenos e toxinas. Alguns desses compostos pertencem às classes de flavonóides, triterpenos, alcalóides e taninos, dentre outras (MARTZ, 1992; REYES-CHILPA; ESTRADA, 1995; CASTRO *et al.*, 1999).

Pesquisas relacionadas a inibidores naturais dos venenos ofídicos são necessárias. Em várias regiões do mundo vêm sendo realizados extensos levantamentos sobre plantas medicinais com potencial atividade neutralizante sobre envenenamentos por picadas de serpentes peçonhentas (MORS, 1991; MARTZ, 1992; JAIN *et al.*, 1993; CASTRO *et al.*, 1999; ABUBAKAR *et al.*, 2000; MORS *et al.*, 1991; 2000; ALAM; GOMES, 2003; ASUZU; HARVEY, 2003; BIONDO *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2003; IZIDORO *et al.*, 2003; PITHAYANUKUL *et al.*, 2004; BORGES *et al.* 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Alguns estudos com plantas que apresentam atividades antiofídicas estão resumidos no Quadro 1.

Planta	Parte utilizada	Veneno de Serpente	Atividade Neutralizada	Referência
<i>Casearia sylvestris</i> (Flacourtiaceae)	Folhas	<i>Bothrops mojen</i> , <i>B. asper</i> , <i>B. nioewiedi</i>	Proteases Fibrinolítica / Coagulante (parcial)	BORGES <i>et al.</i> , 2001
<i>Vitex negundo</i> (Verbenaceae) <i>Emblica officinalis</i> (Euphorbiaceae)	Raízes	<i>Vipera russellii</i> <i>Naja kaouthia</i>	Hemorrágica, Coagulante, Desfibrinogenante, Inflamatória (somente <i>V. russellii</i> ) Letalidade (ambos venenos)	ALAM; GOMES, 2003
<i>Parkia biglobosa</i> (Mimosaceae)	Casca do tronco	<i>Naja nigricollis</i> <i>Echis ocellatus</i>	Neurotóxica Hemotóxica Citotóxica	ASUZU; HARVEY, 2003
<i>Mandevilla velutina</i> (Apocynaceae)	Folhas, talos	<i>Bothrops jararacussu</i> , <i>B. moojeni</i> , <i>B. alternatus</i> , <i>B. pirajai</i> <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Fosfolipásica (para <i>Crotalus durissus terrificus</i> ) Não efetiva para os venenos de <i>Bothrops</i> .	BIONDO <i>et al.</i> , 2003
<i>Masrypianthes chamaedrys</i> (Lamiaceae)	Parte aérea	<i>Bothrops insularis</i> , <i>B. jararacussu</i> , <i>B. nioewiedi</i> , <i>B. alternatus</i> , <i>B. atrox</i> , <i>B. jararaca</i> ; <i>Lachesis muta muta</i> <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Formação do coágulo	CASTRO <i>et al.</i> , 2003
<i>Eclipsa prostata</i> (Asteraceae)	Parte aérea	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Letalidade Hemorrágica	PITHAYANUKUL <i>et al.</i> , 2004
<i>Musa paradisiaca</i> (Musaceae)	Sumo	<i>Bothrops jararacussu</i> , <i>B. nioeweidi</i>	Miotóxica / Hemorrágica / Letalida (somente in vitro)	BORGES <i>et al.</i> , 2005
<i>Piper umbelatum</i> <i>Piper peltatum</i> (Piperaceae)	Ramos	<i>Bothrops atrox</i> , <i>B. asper</i>	Miotoxicidade reduzida Edema	NÚÑEZ <i>et al.</i> , 2005
<i>Bauhinia fortificata</i> (Leguminosae)	Parte aérea	<i>Bothrops jararacussu</i> <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Coagulante Fibrinolítica	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2005
<i>Pentaclethra macroloba</i> (Mimosaceae)	Cascas do tronco	<i>Bothrops</i> spp. (incluindo <i>B. atrox</i> ); <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Hemorrágica / Nucleolítica Fibrinogelítica / Coagulante	SILVA <i>et al.</i> , 2005

Quadro 1 - Plantas com atividades antiofídicas.

## 1.4 A Andiroba

### 1.4.1 Características Gerais

A andiroba (*Carapa guianensis* Aublet, 1775) (Figura 3) é uma planta que pertence à família Meliaceae, geralmente encontrada em florestas tropicais e equatoriais. Apresenta ampla distribuição na Amazônia, América Central e África. No Brasil, ocorre em toda a Bacia Amazônica e na Costa Atlântica (PENNINGTON *et al.*, 1981).

Na Amazônia são conhecidas popularmente como “andiroba” duas espécies da família Meliaceae: *Carapa guianensis* e *Carapa procera*. A *Carapa guianensis* é encontrada por toda a bacia Amazônica, preferencialmente na várzea e áreas alagáveis ao longo dos igapós, enquanto a *Carapa procera* é mais restrita ao norte da América do Sul. No Estado do Amazonas é mais comumente reconhecida como andiroba a espécie *C. guianensis*; entretanto, há registrada a ocorrência da *Carapa procera* e *Carapa guianensis* por intermédio de exsicatas no herbário do INPA, que apresentam maior ocorrência em ambientes de terra firme (FERRAZ *et al.*, 2002).

Seu nome vem do tupi-guarani "andi-roba", isto é, gosto amargo. É uma árvore de médio a grande porte, com tronco reto, com 25–35 m de altura (podendo atingir até 55 m). Prefere várzeas e igapós, mas é também encontrada em terra firme. No Brasil, a floração e a frutificação da andiroba parecem ocorrer durante todo o ano (PENNINGTON *et al.*, 1981; FERRAZ *et al.*, 2002).

A andiroba é uma das árvores de multiuso mais conhecidas em nossa região. Várias de suas partes são empregadas com fim medicinal ou industrial. Produz madeira de boa qualidade que possui uma característica particular: a de não ser atacada por insetos. As folhas e a casca do caule são utilizadas como chás com ação antitérmica, antiinflamatória, anti-

helmíntica e antitumoral. Outros usos são atribuídos a andiroba: na fabricação de velas como repelentes e na produção de cosméticos (HAMMER; JOHNS, 1993; REVILLA, 2000; MARTINBOROUGH *et al.*, 2003; GREENCOTTAGE, 2004; MIOT *et al.*, 2004; RAIN TREE NUTRITION, 2004).

As sementes da andiroba produzem um óleo, popularmente conhecido como óleo de andiroba. É um produto natural bastante utilizado em nossa região para o tratamento de diversas doenças, como artrite, diarreia, diabetes, infecções otológicas; inflamação da garganta; na prevenção de picadas de insetos; no tratamento do câncer uterino e como estimulante digestivo (HAMMER; JOHNS, 1993; REVILLA, 2000; FERRAZ *et al.*, 2002; RAIN TREE NUTRITION, 2004).

#### 1.4.2 Classificação Taxonômica

A andiroba apresenta a seguinte classificação taxonômica (PENNINGTON; STYLES, 1981):

Divisão:	Angiospermae
Classe:	Dicotyledonae
Superordem:	Rutiflorae
Ordem:	Rutales
Família:	Meliaceae
Subfamília:	Swietenioideae
Tribo:	Xylocarpeae
Gênero:	Carapa
Espécies:	<i>Carapa guianensis</i> Aublet, 1775 <i>Carapa procera</i> D.C.

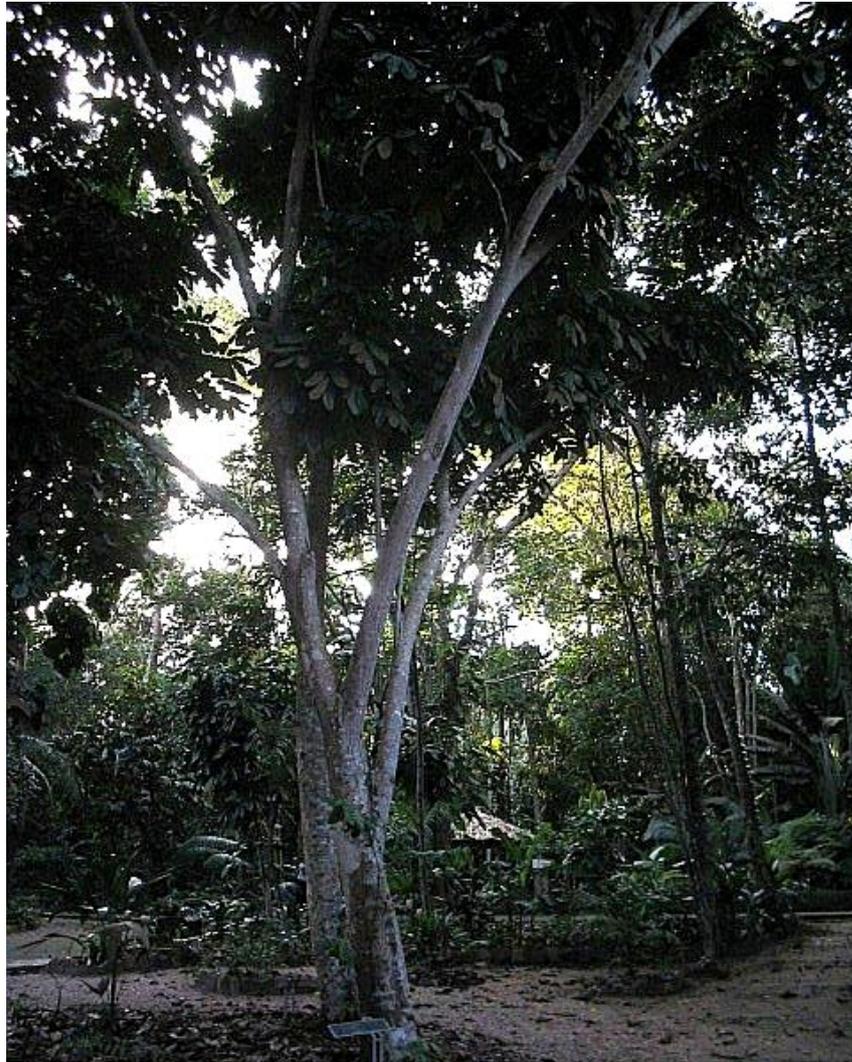


Figura – 3 *Carapa guianensis* Aublet, 1775  
FONTE: Bosque da Ciência (INPA) – Foto: Claudia Pio.



Figura – 4 Sementes de *Carapa guianensis* Aublet, 1775  
FONTE: Bosque da Ciência (INPA) – Foto: Claudia Pio.

### 1.4.3 O Óleo de Andiroba

O óleo extraído das sementes de andiroba apresenta importante participação na economia regional, sendo bastante empregado como fonte de renda e na medicina popular, devido a suas propriedades antiinflamatórias, anti-sépticas, cicatrizantes e inseticidas. No Amazonas, certas comunidades utilizam o óleo de andiroba contra piolhos, coceiras, cicatrizante de ferimentos e para retirar carne crescida dos olhos, além de empregá-lo contra gripe, asma e dor na garganta (MENDONÇA, 2004).

No Acre, comunidades tradicionais do Alto e Médio Rio Gregório (Tarauacá-AC) utilizam o óleo de andiroba contra picadas de serpentes venenosas, escorpiões, abelhas e aranhas (BOUFLEUER *et al.*, 2003).

O método de extração tradicional do óleo de andiroba geralmente é artesanal e encontra-se descrito no Apêndice B.

Popularmente, o óleo é também utilizado para contusões, inchaços, reumatismos e cicatrizações, esfregando-se sobre o local lesado. Na indústria cosmética, usa-se o óleo em sabonetes, xampus e cremes (HAMMER e JOHNS, 1993; REVILLA, 2000).

O óleo de andiroba é um líquido transparente, de gosto extremamente amargo, com coloração amarelo-clara; em temperatura inferior a 25°C solidifica como a vaselina. É composto de oleína (óleo líquido) e palmitina (gordura sólida) e outras glicerinas em proporções mais limitadas. Apresenta densidade a 25°C de 0,930 – 0,941 g/cm<sup>3</sup> (BRASIL, 1998b; RAIN TREE NUTRITION, 2004).

#### 1.4.4 Composição Química

A família Meliaceae é constituída por diferentes compostos químicos, como alcalóides, flavonóides; cromonas; cumarinas; benzofuranos; mono-, sesqui-, di- e triterpenóides; entretanto, destacam-se pela presença de limonóides, isto é, tetranortriterpenóides (TNTP) que apresentam um anel furanil  $\beta$ -substituído no  $C_{17\alpha}$  (TAYLOR, 1984; CHAMPAGNE *et al.*, 1992; MULHOLLAND *et al.*, 2000).

Os limonóides são responsáveis por algumas das atividades biológicas da família Meliaceae, incluindo propriedades reguladoras de crescimento e fago-repelente de insetos, além de atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais (CHAMPAGNE *et al.*, 1992; PEREIRA, 1998; MULHOLLAND *et al.*, 2000).

As propriedades físicas e medicinais do óleo de andiroba são bastante influenciadas por suas características químicas (BRASIL, 1998b; MARTINBOROUGH *et al.*, 2003).

A composição química do óleo de andiroba é quase exclusivamente feita por material saponificável, onde os principais ácidos graxos são o ácido oléico e o ácido palmítico. O teor dos ácidos graxos é bastante variável de acordo com o método de extração empregado (Quadro 2). (LAGO; SIQUEIRA, 1980; BRASIL, 1998b; MARTINBOROUGH *et al.*, 2003; GREENCOTTAGE, 2004; RAIN TREE NUTRITION, 2004).

Compostos	Teor (%)
Saponificáveis (Ácidos Graxos)	Ácido Oléico : 50 – 58 % Ácido Palmítico : 9 – 28 % Ácido Estearico : 8 – 10 % Ácido Linoléico : 4 – 11 % Ácido Palmitoléico: ≤ 1% Ácido Mirístico : < 0,1% Ácidos Voláteis : 0,8 %
Insaponificáveis	Limonóides ou Tetranortriterpenóides (TNTP): 2,0 – 5,0%

Quadro 2 - Composição química do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet).

FONTE: LAGO; SIQUEIRA, 1980; MARTINBOROUGH *et al.*, 2003; GREENCOTTAGE, 2004; RAIN TREE NUTRITION, 2004

Uma pequena porcentagem do óleo de andiroba, de 2 a 5%, é constituída por limonóides – também denominados tetranortriterpenóides (TNTP) – destacando-se: 6 $\alpha$ -acetoxigedunina, 7-deacetoxi-7-oxogedunina, andirobina, angolensato de metila, gedunina e 6 $\alpha$ -acetoxiepoxiázadiradiona, 6 $\beta$ -acetoxigedunina, 11 $\beta$ -acetoxigedunina, 6 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diacetoxigedunina, 6 $\beta$ ,11 $\beta$ -diacetoxigedunina e 6 $\alpha$ -hidroxigedunina. Certas atividades biológicas da andiroba são atribuídas a alguns estes compostos, dentre elas sua ação fago-repelente, antiinflamatória, anti-malárica e antitumoral (TAYLOR, 1984; PEREIRA *et al.*, 1998; MULHOLLAND *et al.*, 2000; RAIN TREE NUTRITION, 2004). As estruturas químicas dos principais tetranortriterpenóides (TNTP) isolados das sementes da andiroba (PEREIRA *et al.*, 1999; MULHOLLAND *et al.*, 2000; PENIDO *et al.*, 2005a) estão na Figura 5.

Estudos químicos empregando HPLC, métodos espectroscópicos (IV, UV, RMN uni e bidimensional) e espectrométricos (EM), vêm sendo realizados a fim de isolar e identificar novos compostos da *Carapa guianensis*, a partir de outras partes da planta, como de suas folhas, galhos, flores e bagaços de suas sementes, com intuito de comprovar ou descobrir novas atividades biológicas (PEREIRA, 1998; ANDRADE *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2003; QI *et al.*, 2003; 2004; PENIDO *et al.*, 2005a; PENIDO *et al.*, 2005b).

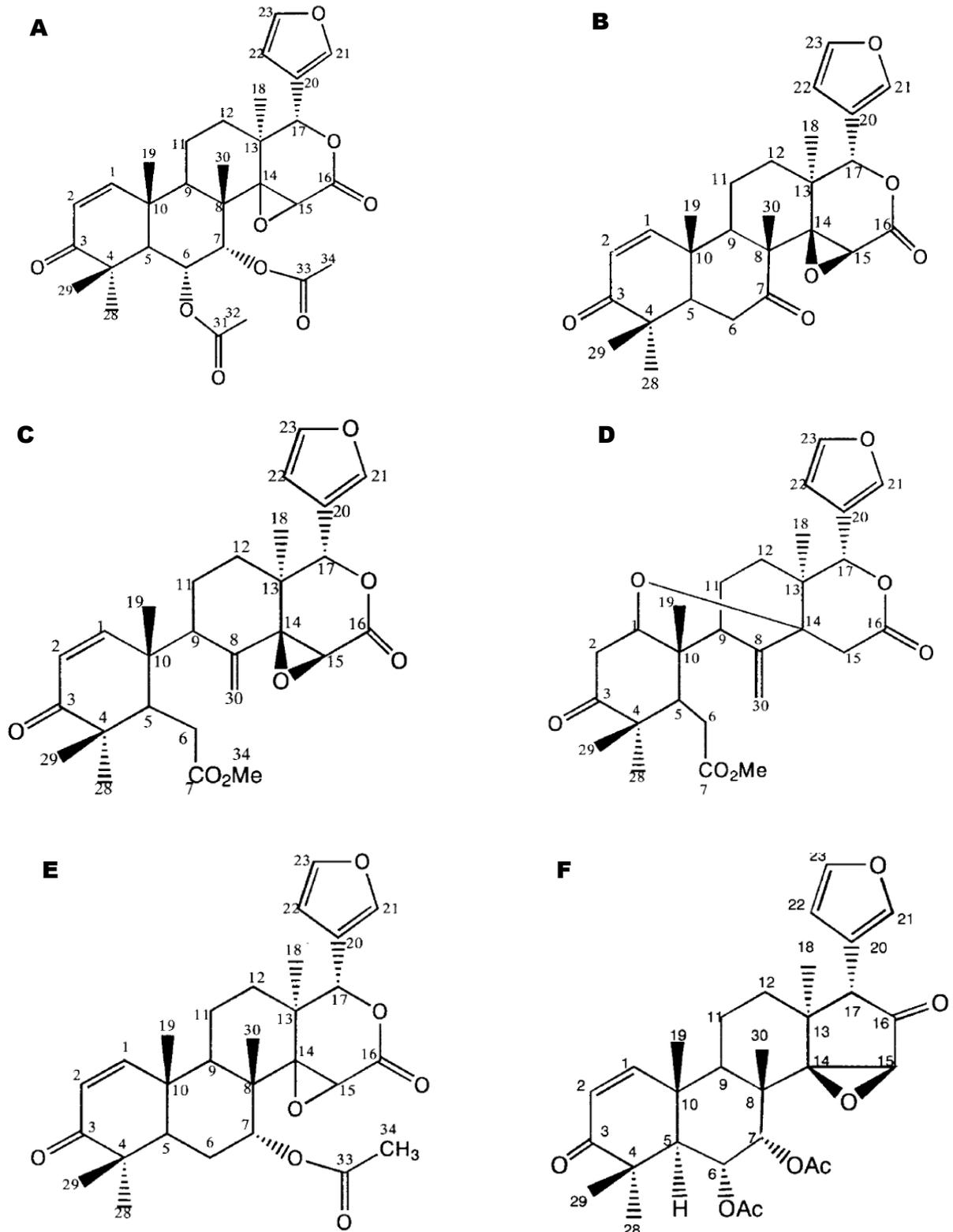


Figura – 5 Estruturas químicas dos principais tetranortriterpenóides (TNTP) isolados das sementes da *Carapa guianensis* Aublet, 1775. A) 6 $\alpha$ -acetoxigedunina; B) 7-deacetoxi-7-oxogedunina; C) andirobina; D) angolensato de metila; E) gedunina e F) 6 $\alpha$ -acetoxiepoxiazadiradiona

FONTE: PEREIRA *et al.*, 1999; MULHOLLAND *et al.*, 2000; PENIDO *et al.*, 2005a

## 2 OBJETIVOS

### 3.1 Geral

Avaliar a atividade do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet, 1775) sobre as atividades biológicas induzidas por venenos de serpentes amazônicas.

### 3.2 Específicos

- Descrever os efeitos farmacológicos gerais do óleo de andiroba, em animais de laboratório.
- Descrever os efeitos do óleo de andiroba sobre o processo inflamatório local induzido pelos venenos de serpentes *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, em animais de laboratório.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Modelo de Estudo

Foi realizado um estudo experimental do tipo pré-clínico, a fim de avaliar o estímulo/efeito do óleo de andiroba, utilizando dois grupos de animais de laboratório (controle e experimental).

Foram avaliados os efeitos farmacológicos gerais do óleo de andiroba, bem como sua ação sobre o processo inflamatório local induzido pelos venenos de serpentes *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, visando contribuir com sua possível atuação como agente antiinflamatório local no caso de acidentes ofídicos.

### 3.2 Universo de Estudo

#### 3.2.1 População de Referência

O presente estudo utilizou uma população de camundongos (*Mus musculus albinus*) do Biotério do Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Bührnheim” da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM.

### 3.2.2 Amostragem

#### 3.2.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus albinus*) de ambos os sexos, adultos, jovens, albinos, não-isogênicos, pesando entre 18–22 g, fornecidos pelo Biotério do Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Bührnheim” da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM. A amostragem foi do tipo aleatória simples. Os camundongos foram separados e identificados individualmente na região caudal com marcas de pincel.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (tipo “mouse pack”), sob temperatura controlada (22-25°C), ciclo de luz de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*.

#### 3.2.2.2 Venenos de Serpentes

Foram utilizados dois “pools” de venenos, obtidos de espécimes de *Bothrops atrox* e de *Crotalus durissus ruruima*, de diferentes tamanhos e ambos os sexos, mantidos nos serpentários do Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Bührnheim” da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM. Os venenos foram obtidos por pressão manual sobre as glândulas de veneno, com prévia anestesia das serpentes com CO<sub>2</sub>. Em seguida foram centrifugados, filtrados com filtros de porosidade igual a 0,45 µm, liofilizados e estocados a –20°C. As soluções de uso de cada veneno foram preparadas a partir de soluções-estoque, minutos antes de cada experimento, e mantidas sob temperatura de congelamento (0 a –10°C) até a sua administração no coxim plantar das patas experimentais dos camundongos.

### 3.2.2.3 Óleo de Andiroba

Foram utilizadas amostras de óleo de andiroba (extrato bruto), fornecidas pelo Banco de Extratos de Plantas Amazônicas do Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Bührnheim” da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMTAM.

## 3.3 Procedimentos

### 3.3.1 Avaliação dos Efeitos Farmacológicos Gerais do Óleo de Andiroba

#### 3.3.1.1 Determinação da Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>)

Para a avaliação da toxicidade aguda foi determinada a DL<sub>50</sub>, ou seja, a dose capaz de matar 50% dos animais testados. A DL<sub>50</sub> do óleo de andiroba foi calculada administrando-se aos camundongos doses crescentes de extrato bruto por via intraperitoneal (i.p.). Foram estabelecidas as doses de 100 µL, 150 µL e 200 µL para cada camundongo (20±2 g), injetadas somente nos grupos experimentais (I e II), com quatro camundongos cada. Ao grupo controle foi administrado azeite de oliva (via i.p.) utilizando as mesmas doses.

Os grupos foram identificados como: grupo experimental I (andiroba filtrada), grupo experimental II (andiroba não-filtrada) e grupo controle III (azeite de oliva) e foram tratados com as doses estabelecidas acima.

Os animais foram injetados e monitorados durante 24 horas, anotando-se o número de mortos. A DL<sub>50</sub> foi calculada pela análise de probitos (FINNEY, 1971).

### 3.3.1.2 Testes Gerais de Atividade Farmacológica

Para a avaliação dos efeitos farmacológicos gerais do óleo de andiroba, foi realizada uma adaptação dos métodos descritos por CARLINI (1972) e MALONE (1977). Foram utilizados os mesmos grupos e doses do item 3.3.1.1.

Os grupos experimentais (n=4) receberam o óleo de andiroba pela via i.p., com as doses estabelecidas no item 3.3.1.1. Uma vez injetados, os animais foram colocados em caixa de contenção de madeira de 1m<sup>3</sup> (1m x 1m x 1m), sem tampa, o que permitiu a observação da movimentação dos camundongos e de suas reações comportamentais, sem qualquer interferência externa. Os animais foram monitorados durante 24 horas e as leituras dos efeitos comportamentais foram registradas em formulário próprio (anexo 1).

A observação dos efeitos farmacológicos gerais foi realizada por um período de 24 horas, nos seguintes intervalos de tempo após a administração por via i.p. do óleo de andiroba: 5, 30 e 60 minutos e 2, 4, 6, 12 e 24 horas.

Nos intervalos de tempo indicados, foram feitas observações individuais para cada grupo por visualização simples, considerando-se os indicadores de toxicidade aguda (ANVISA, 2003), como movimentação, frequência respiratória, piloereção, ptose palpebral, tremores, convulsões, alteração do tônus muscular, contorções abdominais, cianose, hiperemia, sialorréia, diarréia, sudorese, sedação/hipnose, passividade, alienação ambiente, número de animais mortos e agressividade, de acordo com o método descrito por Carlini (1972):

- **Movimentação e frequência respiratória:** foi avaliada mediante observação dos animais a fim de verificar se estes estavam excitados ou deprimidos e se formavam agrupamentos pelos cantos, bem como se estavam ofegantes.

- **Pêlos arrepiados e ptose palpebral:** foi avaliada mediante observação dos animais quanto a presença de eriçamento dos pêlos e o fechamento das pálpebras (ptose). A observação de ptose palpebral sugere a presença de substâncias neurolépticas (efeito tranqüilizante).

- **Contorções abdominais ou “writhing”:** foi avaliada mediante observação dos animais se estes contraíam o abdômen e/ou distendiam as patas posteriores num movimento do tipo peristáltico, a fim de verificar se o extrato era irritante para a mucosa da cavidade abdominal.

- **Tremores ou convulsões:** cada animal era segurado pela cauda e após ligeiro movimento rotatório da mesma pelos dedos polegar e indicador, o animal era solto repentinamente sobre a bancada de laboratório a fim de verificar a presença ou não de convulsão ou tremores.

- **Tônus muscular:** cada animal era retirado da gaiola para verificar se a musculatura abdominal estava flácida e se tinha ou não a capacidade de equilibrar-se sobre um bastão.

- **Lacrimejamento, secreção vermelha nos olhos e salivação:** cada animal foi examinado nos olhos e boca para verificar a presença de quaisquer secreções.

- **Excreção (micção e defecação):** foi observado a excreção de cada animal sobre o fundo branco da caixa, a cada intervalo de tempo.

- **Morte:** foi anotado o número de animais mortos ao fim de 24 horas.

- **Órgãos internos:** após as 24 horas, os animais sobreviventes foram sacrificados, necropsiados e tiveram seus órgãos (fígado, rins, intestinos, pulmão e coração) examinados por visualização simples.

A intensidade de gradação dos efeitos farmacológicos gerais foi definida por:

(0) = ausência; (1) = discreto; (2) = moderado; (3) = acentuado.

### 3.3.2 Avaliação da Atividade Edematogênica do Óleo de Andiroba

#### 3.3.2.1 Administração do Óleo de Andiroba

A administração do óleo de andiroba foi feita pela via i.p., 1 hora antes da administração dos venenos de *Bothrops atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*. Somente os grupos experimentais (tratados) receberam o óleo de andiroba (filtrada), utilizando-se a dose de 150  $\mu$ L para cada camundongo com peso de  $20\pm 2$  g (figura 6).



Figura 6 – Administração do óleo de andiroba. Foi utilizada a dose de 150  $\mu$ L pela via i.p. para cada camundongo ( $20\pm 2$  g), sendo injetado 1 h antes da administração dos venenos de *Bothrops atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*.

Foto por: Cláudia Pio

### 3.3.2.2 Avaliação da Atividade Edematogênica

Para a determinação da cinética da atividade edematogênica foi utilizado o método descrito por FURTADO et al. (1991). Foram utilizados dois grupos (controle e experimental) para cada tipo de veneno, com 14 camundongo em cada grupo.

Uma hora após ter sido administrado o óleo de andiroba, a cada grupo de camundongos foram injetados 5 $\mu$ g de veneno diluídos em 50 $\mu$ L de solução salina (NaCl 0,9%) estéril na região sub-plantar do coxim posterior da pata direita (pata experimental) (figura 7). No coxim posterior da pata esquerda (pata controle), foram injetados somente 50 $\mu$ L de solução salina (NaCl 0,9%) estéril.



Figura 7 – Administração dos venenos. Foram administrados os venenos de *Bothrops atrox* ou *Crotalus durissus ruruima* (5 $\mu$ g de veneno / 50 $\mu$ L de NaCl 0,9%) na região sub-plantar do coxim posterior da pata direita (pata experimental).

Foto por: Cláudia Pio

As espessuras dos coxins das patas posteriores (controle e experimental) foram medidas com um paquímetro digital (Starrett, USA), com sensibilidade de  $\pm 0,03\text{mm}$ , nos intervalos de tempo 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a injeção do veneno de *Bothrops atrox*, e nos intervalos de tempo 1, 3, 6 horas após a injeção do veneno de *Crotalus durissus ruruima*.

A estimativa da atividade edematogênica (% edema) foi expressa pela diferença entre o aumento de espessura dos coxins das patas experimental e controle, dividido pela espessura da pata controle e multiplicado por 100.

$$\% \text{ Edema} = \frac{\text{Espessura Pata Experimental} - \text{Espessura Pata Controle}}{\text{Espessura Pata Controle}} \times 100$$

A estimativa de inibição da atividade edematogênica pelo extrato bruto do óleo de andiroba (% inibição) foi realizada nos intervalos de tempo descritos acima para cada tipo de veneno e calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \left[ \frac{\text{Média \% Edema Grupo Experimental}}{\text{Média \% Edema Grupo Controle}} \times 100 \right]$$

### 3.3.3 Análise Histopatológica

A análise histopatológica foi realizada por um único anátomopatologista, nos Laboratórios de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS), da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM).

#### 3.3.3.1 Obtenção de Amostras Teciduais

Para os grupos controle e experimental foram coletadas amostras de tecido dos coxins das patas posteriores direita (experimental) e esquerda (controle), nos intervalos de tempo de 3 e 12 horas (para o veneno de *Bothrops atrox*) e 3 e 6 horas (para o veneno de *Crotalus durissus ruruima*), a fim de ser realizada a análise histopatológica.

A cada medição das espessuras das patas, de acordo com os intervalos de tempo estabelecidos acima, quatro camundongos foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical e os coxins das patas posteriores foram removidos com tesoura cirúrgica e fixados separadamente em solução de formalina tamponada a 10% (PROPHET, 1994a). A fim de penetrar e preservar melhor as características citoplasmáticas e nucleares das amostras teciduais, o tempo mínimo para a fixação de cada peça foi de seis horas. O tempo máximo foi indeterminado, uma vez que a formalina tamponada a 10% é uma solução fixadora padrão e serve para preservar diferentes espécimes patológicos por longos períodos de tempo.

As amostras teciduais foram identificadas e processadas no Laboratório de Anatomia Patológica da UFAM. Uma vez preparados os cortes histológicos, as lâminas foram enviadas para o Laboratório de Anatomia Patológica da FMT-AM para o estudo histopatológico. Os animais sobreviventes foram sacrificados ao final do experimento (por deslocamento da coluna cervical ou por inalação com éter).

### 3.3.3.2 Procedimentos Histopatológicos

Os procedimentos histopatológicos realizados consistiram basicamente nas seguintes etapas (descritas no Apêndice A).

- a) Fixação em formalina tamponada a 10%;
- b) Descalcificação com ácido fórmico a 10%;
- c) Processamento tecidual das amostras;
- d) Microtomia;
- e) Coloração histológica;
- f) Montagem das lâminas

### 3.3.3.3 Leitura das Lâminas

A leitura das lâminas foi realizada por um único anátomo-patologista, obedecendo aos seguintes critérios:

**a) Medição do edema ( $\mu$ ):** O edema foi medido na derme, no espaço compreendido entre as células da camada basal da epiderme e a musculatura esquelética. As medições do edema foram feitas em três pontos diferentes do corte histológico, na face ventral, utilizando a objetiva de **10x**. Foi utilizado um microscópio com câmera acoplada e ocular reticulada, da marca Zeiss Axioplan.

**b) Infiltrado leucocitário:** a contagem de leucócitos foi realizada observando cinco campos e utilizando a objetiva de **40x**. Todos os leucócitos foram contados na região da derme, onde estava localizado o edema.

**c) Hemorragia:** a contagem de hemácias foi realizada observando cinco campos e utilizando a objetiva de **40x**. Todas as hemácias foram contadas na região da derme, onde estava localizado o edema.

Nos casos em que a hemorragia era difusa, especialmente no veneno de *Bothrops atrox*, foi observada por área utilizando campo de grande aumento (25x) e intensificada como: ausente, leve (<25 hemácias por campo), moderada (25 – 50 hemácias por campo) e acentuada (> 50 hemácias por campo).

**d) Miocitólise:** foi observada por área utilizando campo de grande aumento (25x) e intensificada como: ausente, leve (<25% de área lesada), moderada (25 – 50 % de área lesada) e acentuada (> 50% de área lesada).

A intensidade de gradação do edema, do infiltrado inflamatório, da hemorragia e da miocitólise foi definida por: 0 = ausência; (1) = discreto/leve; (2) = moderado; (3) = acentuado.

### 3.4 Análise Estatística

Foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão os resultados das medições (em milímetros) das espessuras dos coxins das patas controle e experimental e da análise histopatológica: infiltrado inflamatório (número de leucócitos em 5 campos observados) e edema ( $\mu$ ).

Comparações estatísticas entre os grupos controle e experimental para cada tipo de veneno foram realizadas utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, para nível de significância de 5% ( $p$  valor  $< 0,05$ ), utilizando-se os softwares EPI Info 3.3 for Windows e Sigma STAT versão 3.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação dos Efeitos Farmacológicos Gerais do Óleo de Andiroba

#### 4.1.1 Determinação da Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>)

Neste estudo a dose letal (DL<sub>50</sub>) do óleo de andiroba via i.p. foi determinada em 200µL/20±2g de peso (ou 10 mL/kg).

#### 4.1.2 Testes Gerais de Atividade Farmacológica

Os principais efeitos farmacológicos observados após a administração do óleo de andiroba na doses de 100, 150 e 200µL (via i.p.) nos grupos experimentais estudados estão descritos abaixo. O grupo CONTROLE recebeu azeite de oliva via i.p. nas mesmas doses.

##### 4.1.2.1 Grupo EXPERIMENTAL I (Andiroba Não Filtrada):

A movimentação e a frequência respiratória desses animais com a dose de 100 µL foram moderadas nos primeiros 30 minutos, tornando-se discretas geralmente a partir de 1-2 horas após a injeção do extrato; com as doses subsequentes (150 e 200 µL) observou-se movimentação e frequência de moderada a acentuada nos primeiros 5 minutos, tornando-se discreta antes da primeira hora, com tendência dos animais em ficarem agrupados num só canto, conforme a dose era aumentada.

No local da injeção foi observado prurido em todas as doses, variando de moderado a acentuado logo nos primeiros 5 minutos, tornando-se discreto a partir de 30 minutos e desaparecendo de 4-12 horas depois, de acordo com o aumento da dose. No local da injeção foi notada sudorese moderada, em todas as doses administradas, que permaneceu por um período de até 12 horas após a injeção.

Foi observada ptose palpebral sem secreção ocular (em dois animais) nos primeiros 30 minutos com as doses de 100 e 150 $\mu$ L, com duração de 4 a 12 horas, respectivamente. Com a dose de 200  $\mu$ L, o início da ptose ocorreu com 5 minutos após a injeção, com duração de 6 – 24 horas; foi observada a presença de secreção em apenas um dos camundongos.

A excreção foi normal em todas as doses. Os órgãos internos (rins, coração, pulmão, fígado e cavidade peritoneal) dos animais não apresentaram mudanças na coloração a dose de 100  $\mu$ L. Entretanto foi observada discreta hemorragia na cavidade peritoneal com as doses de 150  $\mu$ L e 200  $\mu$ L.

#### 4.1.2.2 Grupo EXPERIMENTAL II (Andiroba Filtrada):

Apresentaram os mesmos efeitos observados no grupo I, entretanto em menor intervalo de tempo.

#### 4.1.2.3 Grupo CONTROLE III (Azeite de Oliva):

A movimentação e a frequência respiratória desses animais com as doses de 100 e 150 $\mu$ L mostraram-se moderadas nos primeiros 30 minutos, tornando-se discretas geralmente a partir de 1 hora após a injeção do extrato; com a dose de 200  $\mu$ L observou-se movimentação e frequência acentuada nos primeiros 5 minutos, tornando-se moderada antes da primeira hora e permanecendo assim ao longo das 24 horas. Os animais não tenderam a formar grupos num só canto.

No local da injeção foi observado prurido em todas as doses, variando de discreto a moderado nos primeiros 5 minutos, desaparecendo em menos de 1 – 2 horas, de acordo com o aumento da dose. Além do prurido, não foram observadas outras alterações no local da injeção ao longo das 24 horas.

A excreção foi normal em todas as doses. Os órgãos internos (rins, coração, pulmão, fígado e cavidade peritoneal) dos animais não apresentaram mudanças na coloração e nem presença de hemorragia interna em nenhuma das doses administradas.

Não foram observadas outras alterações, como tremores ou convulsões, alteração do tônus muscular, contorções abdominais, cianose, hiperemia, sialorréia, diarreia, sedação/hipnose, passividade, alienação ambiente e agressividade em nenhum dos grupos avaliados.

## 4.2 Efeito do Óleo de Andiroba sobre a Atividade Edematogênica dos Venenos das Serpentes

Os resultados da cinética do efeito edematogênico induzido pelos venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* estão demonstrados nas Figuras 8 e 9.

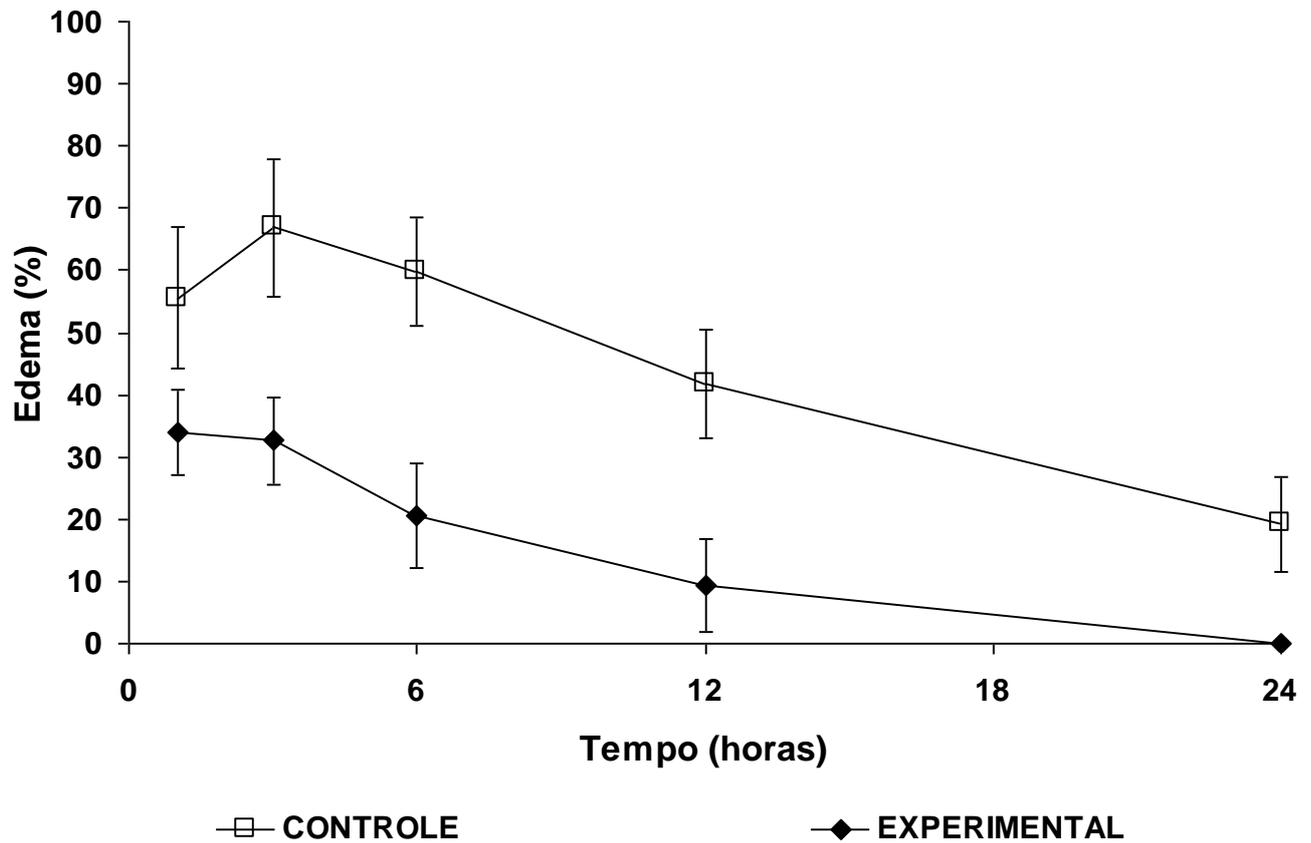
No grupo CONTROLE (não-tratado) o veneno de *Bothrops atrox* induziu logo na primeira hora 55,44% de atividade edematogênica, havendo um aumento máximo (66,09%) com 3 horas e diminuindo até 19,21% ao final das 24 horas analisadas. Em contraste, o grupo EXPERIMENTAL (tratado) obteve uma indução inicial de 33,93% de atividade edematogênica na primeira hora, diminuindo consistentemente até 0% de atividade ao final de 24 horas (Figura 8).

Com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* observou-se que no grupo CONTROLE a indução da atividade edematogênica na primeira hora foi de 20,82%, com discreto aumento (24,50%) após 3 horas e diminuindo até 5,40% após 6 horas. Em contraste, o grupo EXPERIMENTAL (tratado) atingiu cerca de 11,99% na primeira hora, diminuindo progressivamente até 0% em apenas 6 horas. Devido à alta letalidade desse veneno, não foi possível acompanhar os resultados nas 24 horas (Figura 9).

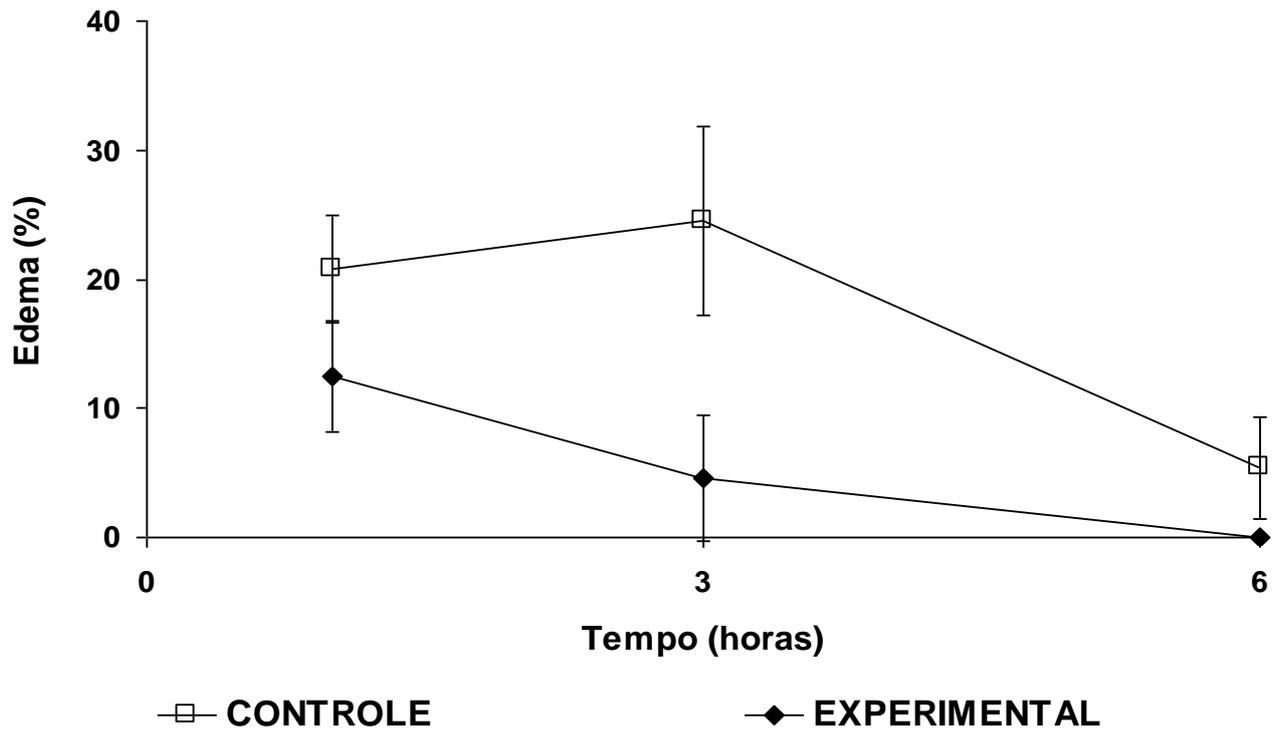
A atividade inibitória do óleo de andiroba sobre a atividade edematogênica induzida pelos venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* pode ser observada na Tabela 1.

Venenos	Atividade Inibitória do Óleo de Andiroba (%)				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
<i>Bothrops atrox</i> (n=14)	37,67	50,64	65,70	77,71	100
<i>Crotalus durissus ruruima</i> (n=14)	42,41	82,37	100	—	—

**Tabela 1.** Atividade inibitória do óleo de andiroba (150 µL via i.p.) sobre o edema de pata induzido pelos venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* (n=14 animais/grupo).

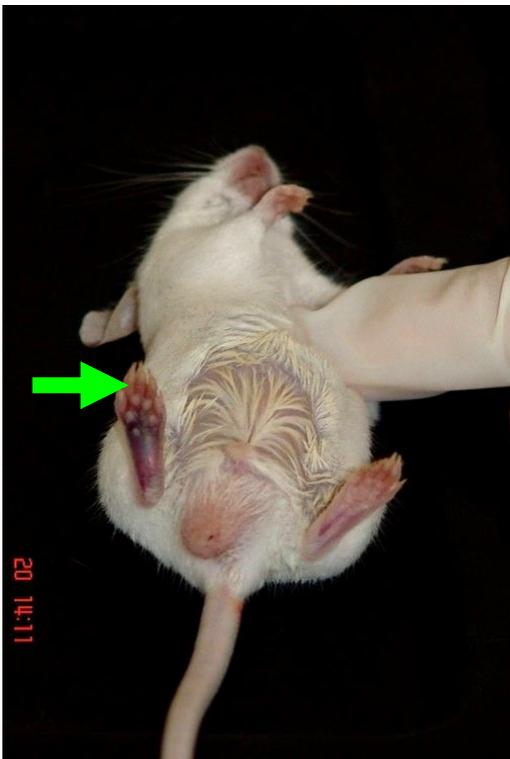


**Figura – 8** Efeito do óleo de andiroba sobre a cinética da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*. O edema foi avaliado pela medição do diâmetro das patas com um paquímetro em 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração do veneno de *Bothrops atrox* (5 µg/50µL NaCl 0,9% via i.pl.) na pata direita; a pata contralateral recebeu somente NaCl 0,9% (50µL). Os resultados representam a média ± DP de 6–14 animais por grupo. O grupo experimental foi injetado com o óleo de andiroba (via i.p.) uma hora antes da administração do veneno. O grupo controle não recebeu o óleo de andiroba (via i.p.).



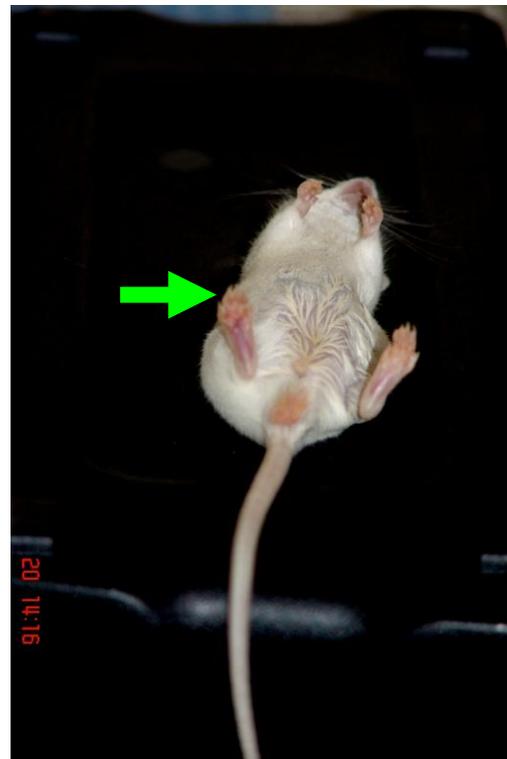
**Figura – 9** Efeito do óleo de andiroba sobre a cinética da atividade edematogênica do veneno de *Crotalus durissus ruruima*. O edema foi avaliado pela medição do diâmetro das patas com um paquímetro em 1, 3 e 6 horas após a administração do veneno de *Crotalus durissus ruruima* (5 µg/50µL NaCl 0,9% via i.pl.) na pata direita; a pata contralateral recebeu somente NaCl 0,9% (50µL). Os resultados representam a média ± DP de 6–14 animais por grupo. O grupo experimental foi injetado com o óleo de andiroba (via i.p.) uma hora antes da administração do veneno. O grupo controle não recebeu o óleo de andiroba (via i.p.).

A avaliação da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox* demonstrou que o grupo EXPERIMENTAL injetado com óleo de andiroba apresentou edema de menor intensidade e diminuição progressiva com o tempo, em relação ao grupo CONTROLE injetado com solução salina (Figura 10). Resultado semelhante foi observado com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* (Figura 11).



**Figura – 10 Edema de pata induzido pelo veneno de *Bothrops atrox*.**  
No grupo experimental verifica-se que a pata experimental (seta) apresenta edema e hemorragia intensos, enquanto a pata controle, que recebeu salina, apresenta-se normal após 3 horas.

**Foto:** Cláudia Pio



**Figura – 11 Edema de pata induzido pelo veneno de *Crotalus durissus ruruima*.**  
No grupo experimental verifica-se que a pata experimental (direita) (seta) apresenta edema intenso e hemorragia moderada após 3 horas.

**Foto:** Cláudia Pio

### 4.3 Análise Histopatológica

#### 4.3.1 Análise Histopatológica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*

Os resultados da análise histopatológica dos grupos CONTROLE e EXPERIMENTAL induzidos com o veneno de *Bothrops atrox*, no intervalo de tempo de 3 e 12 horas após a injeção do óleo de andiroba via i.p., estão representados na Tabela 2 e 3. As Figuras 12 e 13 mostram as faces dorsal e ventral da pata controle normal, injetadas com 50 µL de NaCl 0,9%.

No intervalo de tempo de 3 horas após a injeção do veneno, o grupo CONTROLE (não-tratado) apresentou o quadro histopatológico característico da inflamação local induzida por este tipo de veneno. Na pata experimental (pata direita) foi observado infiltrado inflamatório acentuado (Figura 18); edema acentuado e hemorragia acentuada (Figuras 14 a 17); observou-se também moderada miocitólise (Figura 20). Na pata controle (pata esquerda) o infiltrado inflamatório foi moderado, com edema discreto e notou-se a ausência de hemorragia e miocitólise (Figura 21).

Já o grupo EXPERIMENTAL (tratado) apresentou em sua pata experimental discreto infiltrado inflamatório e edema moderado (Figura 19), hemorragia acentuada e miocitólise de moderada a acentuada (Figura 20). A pata controle (pata esquerda) apresentou infiltrado inflamatório discreto, edema discreto e ausência de hemorragia e miocitólise.

Houve diferença significativa entre as patas experimentais (patas direitas) que receberam o veneno de *Bothrops atrox* nos grupos CONTROLE e EXPERIMENTAL quanto ao infiltrado inflamatório ( $p\text{-valor}=0,029$ ). Foi observada uma diminuição de 87,03% no número de células inflamatórias do grupo EXPERIMENTAL em relação ao grupo CONTROLE às 3 horas.

Em relação ao edema, a hemorragia e a miocitólise não foi observada diferença estatística significativa ao nível de 5% entre as patas experimentais e entre as patas controle, tanto no grupo tratado como no não-tratado. Apesar disso, observou-se histologicamente uma diminuição em 29,18 % do edema nas patas experimentais do grupo experimental em relação ao grupo controle. Hemorragia e miocitólise não foram influenciadas com a administração do óleo de andiroba, em relação ao grupo controle.

	<i>Bothrops atrox</i> (3 horas)		
	Pata EXPERIMENTAL (DIREITA) (5 µg de veneno)		
	GRUPO CONTROLE (n=4)	GRUPO EXPERIMENTAL (n=4)	
	Média±DP	Média±DP	<i>p</i>
Infiltrado inflamatório (nº leucócitos/5campos)	40,50 ± 18,07	5,25 ± 0,70	0,029
Edema (µ)	64,60 ± 31,71	45,75 ± 11,72	0,486

**Tabela 2.** Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas experimentais dos camundongos, induzidas com o veneno de *Bothrops atrox*, 3 horas após a injeção do veneno. Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP) e *p*-valor (n=4 animais/grupo).

	<i>Bothrops atrox</i> (3 horas)		
	Pata EXPERIMENTAL (ESQUERDA) (50 µL de NaCl 0,9%)		
	GRUPO CONTROLE (n=4)	GRUPO EXPERIMENTAL (n=4)	
	Média±DP	Média±DP	<i>p</i>
Infiltrado inflamatório (nº leucócitos/5campos)	1,35 ± 0,61	0,70 ± 0,23	0,114
Edema (µ)	16,75 ± 9,60	15,75 ± 5,90	0,865

**Tabela 3.** Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas controle dos camundongos, induzidas com solução salina (NaCl 0,9%), 3 horas após a injeção do veneno. Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP) e *p*-valor (n=4 animais/grupo).

Às 12 horas, o grupo CONTROLE e EXPERIMENTAL mantiveram efeitos semelhantes aos observados às 3 horas. No grupo CONTROLE, foi observada discreta diminuição no edema (Figuras 22 e 24) e infiltrado inflamatório acentuado (Figuras 24 e 26). No grupo EXPERIMENTAL houve diminuição no infiltrado inflamatório (Figura 25) e no edema (Figuras 23 e 25), entretanto a hemorragia permaneceu acentuada (Figura 23) e a miocitólise moderada (Figura 25).

Quanto ao infiltrado inflamatório, observou-se diferença significativa entre as patas experimentais dos grupos CONTROLE e EXPERIMENTAL ( $p$ -valor=0,029). Demonstrou-se histologicamente uma diminuição de 82,10% no infiltrado inflamatório do grupo EXPERIMENTAL (Figura 25) em relação ao grupo CONTROLE (Figura 26) às 12 horas.

Estatisticamente não foi observada diferença significativa ao nível de 5% em relação ao edema, a hemorragia e a miocitólise entre as patas experimentais e entre as patas controle, tanto no grupo tratado como no não-tratado. Entretanto, assim como às 3 horas, pôde-se observar histologicamente uma diminuição em 32,55 % do edema nas patas experimentais do grupo EXPERIMENTAL em relação ao grupo CONTROLE. Hemorragia e miocitólise não foram influenciadas com a administração do óleo de andiroba, em relação ao grupo CONTROLE.

	<i>Bothrops atrox</i> (12 horas)		
	Pata EXPERIMENTAL (DIREITA) (5 µg de veneno)		
	GRUPO CONTROLE (n=4)	GRUPO EXPERIMENTAL (n=4)	
	Média±DP	Média±DP	<i>p</i>
Infiltrado inflamatório (n° leucócitos/5campos)	35,20 ± 6,22	6,30 ± 2,29	0,029
Edema (µ)	64,50 ± 13,82	43,50 ± 15,54	0,114

**Tabela 4.** Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas experimentais dos camundongos, induzidas com o veneno de *Bothrops atrox*, 12 horas após a injeção do veneno. Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP) e *p*-valor (n=4 animais/grupo).

	<i>Bothrops atrox</i> (12 horas)		
	Pata EXPERIMENTAL (ESQUERDA) (50 µL de NaCl 0,9%)		
	GRUPO CONTROLE (n=4)	GRUPO EXPERIMENTAL (n=4)	
	Média±DP	Média±DP	<i>p</i>
Infiltrado inflamatório (n° leucócitos/5campos)	0,95 ± 0,19	1,80 ± 0,98	0,200
Edema (µ)	18,25 ± 2,06	17,50 ± 2,08	0,686

**Tabela 5.** Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas controle dos camundongos, induzidas com solução salina (NaCl 0,9%), 12 horas após a injeção do veneno. Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP) e *p*-valor (n=4 animais/grupo).

#### 4.3.2 Análise Histopatológica induzida pelo veneno de *Crotalus durissus ruruima*

Os resultados da análise histopatológica dos grupos controle e experimental induzidos com o veneno de *Crotalus durissus ruruima*, no intervalo de tempo de 3 e 6 horas após a injeção do veneno, são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Às 3 horas, o grupo CONTROLE apresentou na pata experimental (pata direita) infiltrado inflamatório discreto (Figuras 27 e 29), edema discreto a moderado (Figuras 27 e 29), ausência de hemorragia (Figura 27) e miocitólise discreta a moderada (Figura 29). Na pata controle (pata esquerda), foi observada a ausência de infiltrado inflamatório, edema, hemorragia e miocitólise (Figura 33).

No grupo EXPERIMENTAL observou-se na pata experimental infiltrado inflamatório discreto (Figuras 28 e 30), edema de discreto a moderado (Figuras 28 e 30), discreta hemorragia e miocitólise acentuada (Figura 30). Na pata controle (pata esquerda) houve infiltrado inflamatório discreto, edema discreto e ausência de hemorragia e miocitólise.

Houve diferença significativa entre as patas experimentais que receberam o veneno de *Crotalus durissus ruruima* (pata direita) dos grupos CONTROLE e EXPERIMENTAL somente para o infiltrado inflamatório ( $p\text{-valor}=0,029$ ). Foi observada uma diminuição de 89,37% no infiltrado inflamatório do grupo EXPERIMENTAL em relação ao grupo CONTROLE às 3 horas.

Em relação ao edema, a hemorragia e a miocitólise, assim como no veneno de *Bothrops atrox*, não foi observada diferença estatística significativa ao nível de 5% entre as patas experimentais e entre as patas controle, tanto no grupo tratado como no não-tratado.

Porém histologicamente observou-se uma redução em 30,87% do edema nas patas experimentais do grupo EXPERIMENTAL em relação ao grupo CONTROLE. Hemorragia e miocitólise também não foram influenciadas com a administração do óleo de andiroba, em relação ao grupo CONTROLE.

	<i>Crotalus durissus ruruima</i> (3 horas)		
	Pata EXPERIMENTAL (DIREITA) (5 µg de veneno)		
	GRUPO CONTROLE (n=4)	GRUPO EXPERIMENTAL (n=4)	
	Média±DP	Média±DP	<i>p</i>
Infiltrado inflamatório (nº leucócitos/5campos)	33,40 ± 11,24	3,55 ± 2,23	0,029
Edema (µ)	37,25 ± 8,18	25,75 ± 15,06	0,343

**Tabela 6.** Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas experimentais dos camundongos, induzidas com o veneno de *Crotalus durissus ruruima*, 3 horas após a injeção do veneno. Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP) e *p*-valor (n=4 animais/grupo).

	<i>Crotalus durissus ruruima</i> (3 horas)		
	Pata EXPERIMENTAL (ESQUERDA) (50 µL de NaCl 0,9%)		
	GRUPO CONTROLE (n=4)	GRUPO EXPERIMENTAL (n=4)	
	Média±DP	Média±DP	<i>p</i>
Infiltrado inflamatório (nº leucócitos/5campos)	7,20 ± 7,42	2,05 ± 2,51	0,200
Edema (µ)	27,50 ± 6,55	17,25 ± 4,85	0,114

**Tabela 7.** Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas controle dos camundongos, induzidas com solução salina (NaCl 0,9%), 3 horas após a injeção do veneno. Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP) e *p*-valor (n=4 animais/grupo).

Às 6 horas, o grupo CONTROLE apresentou infiltrado inflamatório discreto, edema discreto, ausência de hemorragia e miocitólise moderada na pata experimental (Figura 20); na pata controle foi observado infiltrado inflamatório discreto, edema moderado e ausência de hemorragia e miocitólise.

No grupo EXPERIMENTAL observou-se edema moderado, ausência de hemorragia e miocitólise acentuada com vacuolização das fibras musculares (pata experimental), entretanto com discreto infiltrado inflamatório (Figura 22). Na pata controle (pata esquerda) houve infiltrado inflamatório discreto, edema discreto e ausência de hemorragia e miocitólise.

Em relação ao infiltrado inflamatório, foi observada diferença significativa entre os grupos EXPERIMENTAL e CONTROLE, com uma redução de 75,60%.

Edema, hemorragia e miocitólise não apresentaram significância estatística ao nível de 5% ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

	<i>Crotalus durissus ruruima</i> (6 horas)		
	Pata EXPERIMENTAL (DIREITA) (5 µg de veneno)		
	GRUPO CONTROLE (n=4)	GRUPO EXPERIMENTAL (n=4)	
	Média±DP	Média±DP	<i>p</i>
Infiltrado inflamatório (nº leucócitos/5campos)	10,45 ± 7,12	2,55 ± 1,02	0,029
Edema (µ)	18,25 ± 4,27	17,50 ± 3,10	0,886

**Tabela 8.** Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas experimentais dos camundongos, induzidas com o veneno de *Crotalus durissus ruruima*, 6 horas após a injeção do veneno. Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP) e *p*-valor (n=4 animais/grupo).

	<i>Crotalus durissus ruruima</i> (6 horas)		
	Pata EXPERIMENTAL (ESQUERDA) (50 µL de NaCl 0,9%)		
	GRUPO CONTROLE (n=4)	GRUPO EXPERIMENTAL (n=4)	
	Média±DP	Média±DP	<i>p</i>
Infiltrado inflamatório (nº leucócitos/5campos)	1,30 ± 0,47	1,20 ± 0,43	0,686
Edema (µ)	20,50 ± 1,73	20,25 ± 5,31	0,486

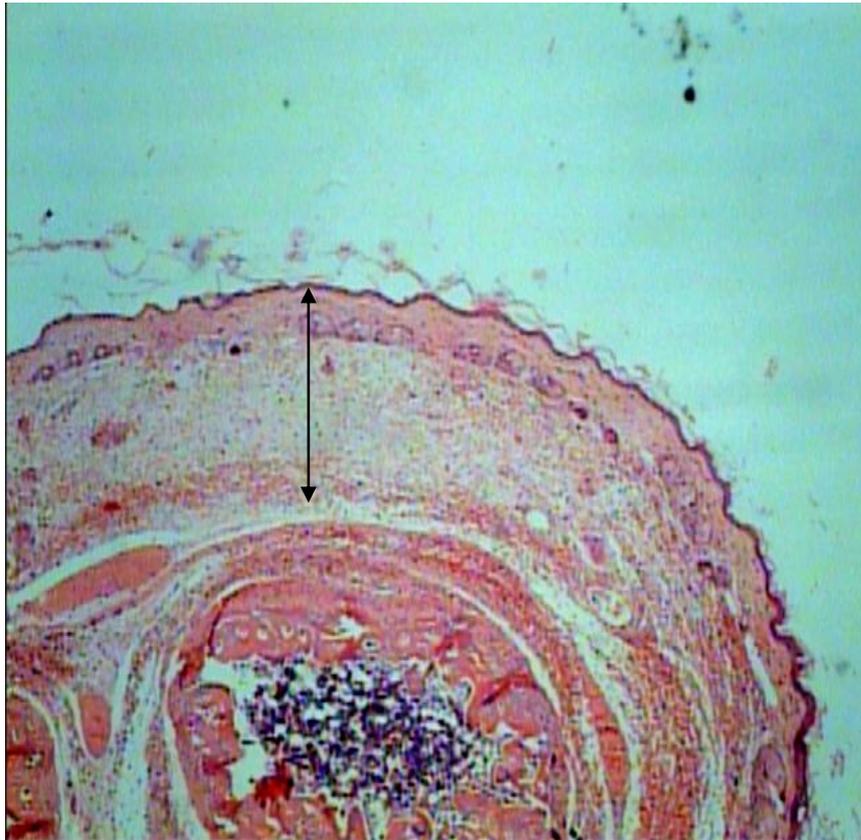
**Tabela 9.** Avaliação do infiltrado inflamatório e do edema observados entre as patas controle dos camundongos, induzidas com solução salina (NaCl 0,9%), 6 horas após a injeção do veneno. Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP) e *p*-valor (n=4 animais/grupo).



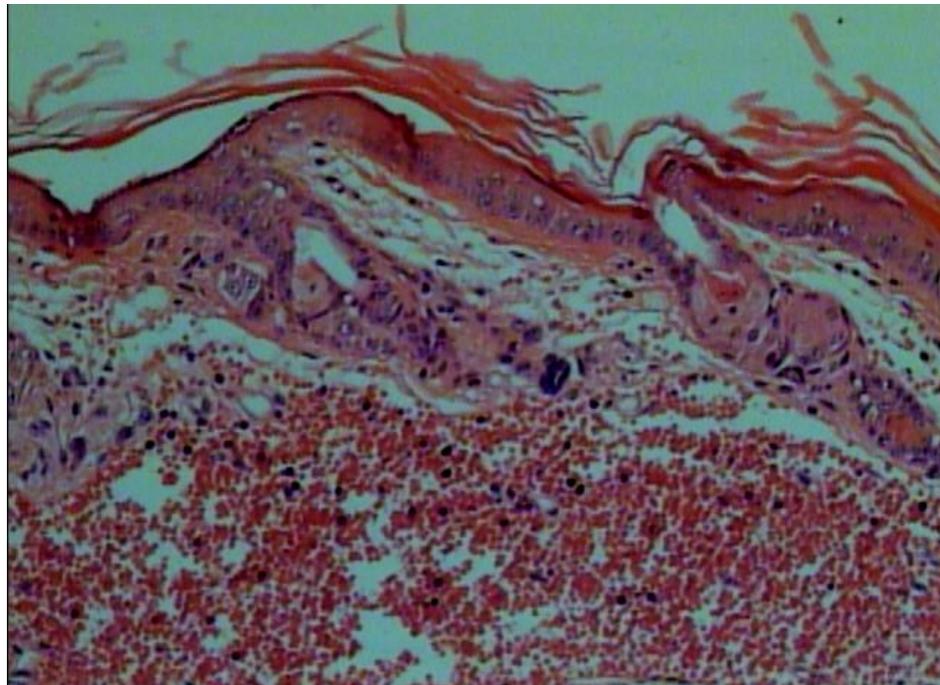
**Figura – 12** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo injetado com solução salina (NaCl 0,9%) – Face dorsal normal. Ausência de edema, hemorragia e miocitólise. Coloração HE (50x).



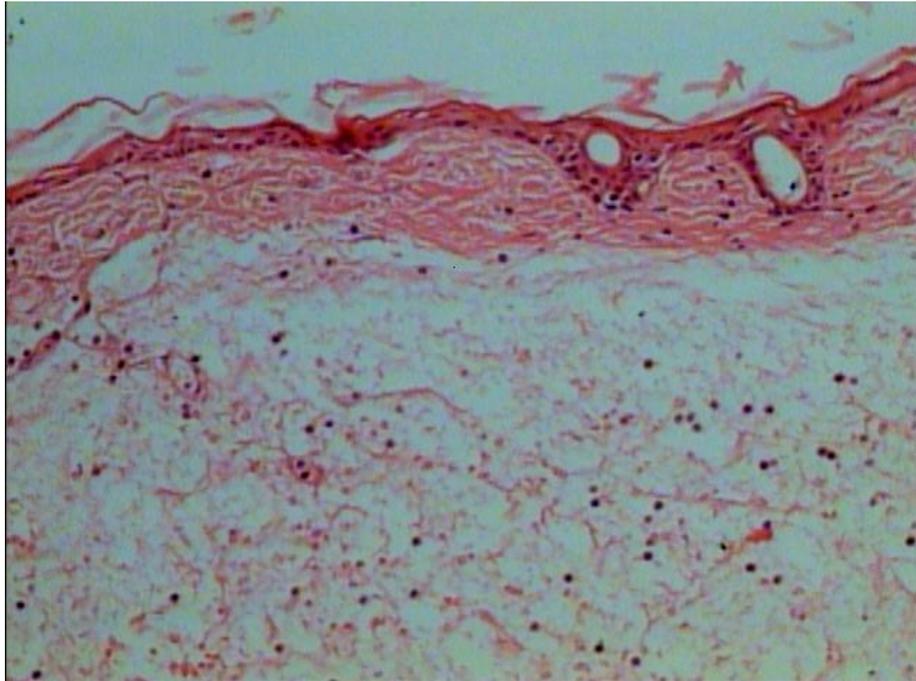
**Figura – 13** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo injetado com solução salina (NaCl 0,9%) – Face ventral normal. Ausência de edema, hemorragia e miocitólise. Coloração HE (100x).



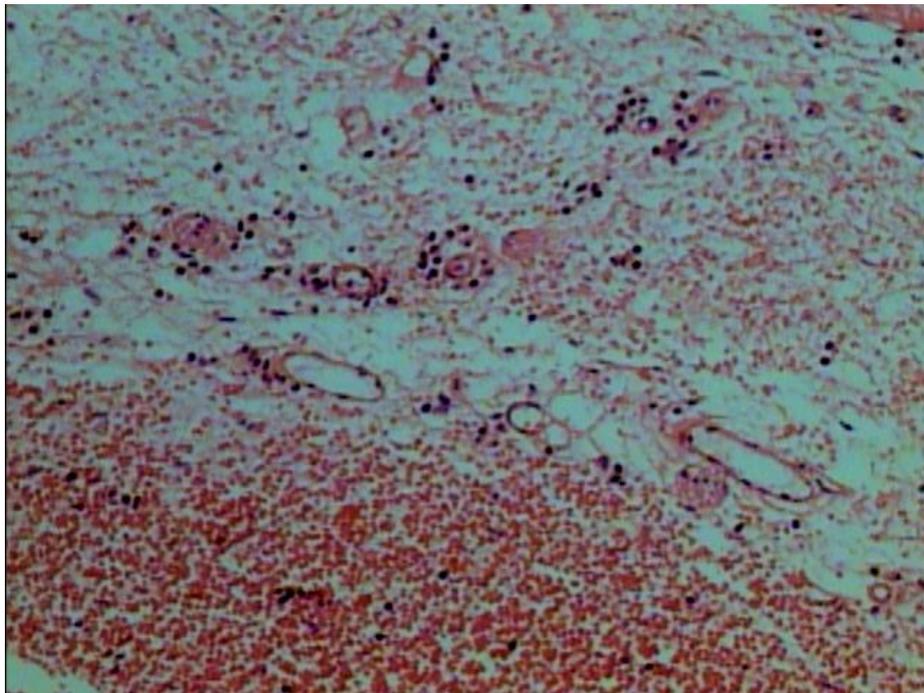
**Figura – 14** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo CONTROLE. Edema acentuado e hemorragia acentuada. O edema foi medido na área indicada pela seta. Coloração HE (50x).



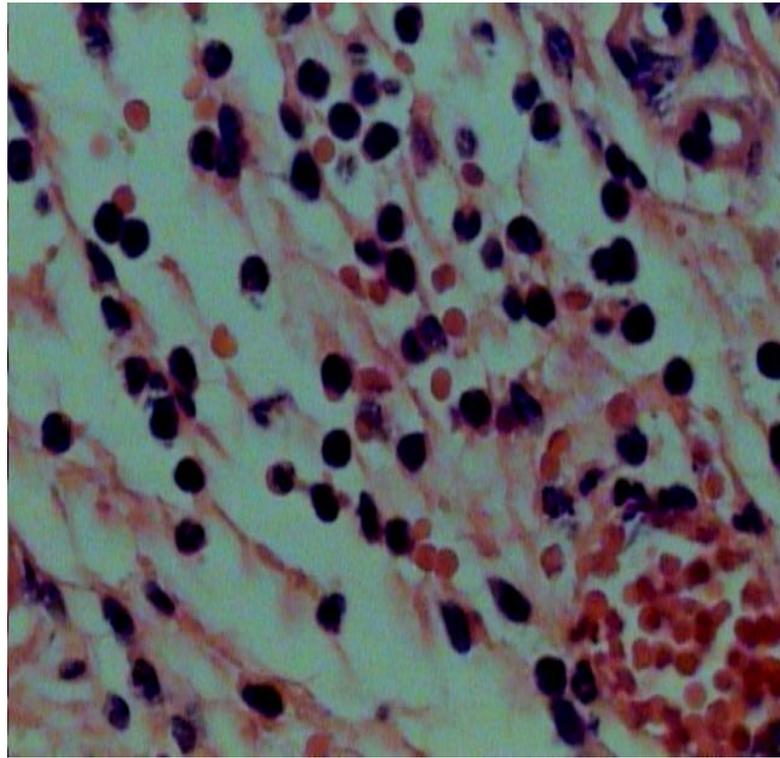
**Figura – 15** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo CONTROLE. Infiltrado inflamatório moderado, edema moderado e hemorragia acentuada. Coloração HE (100x).



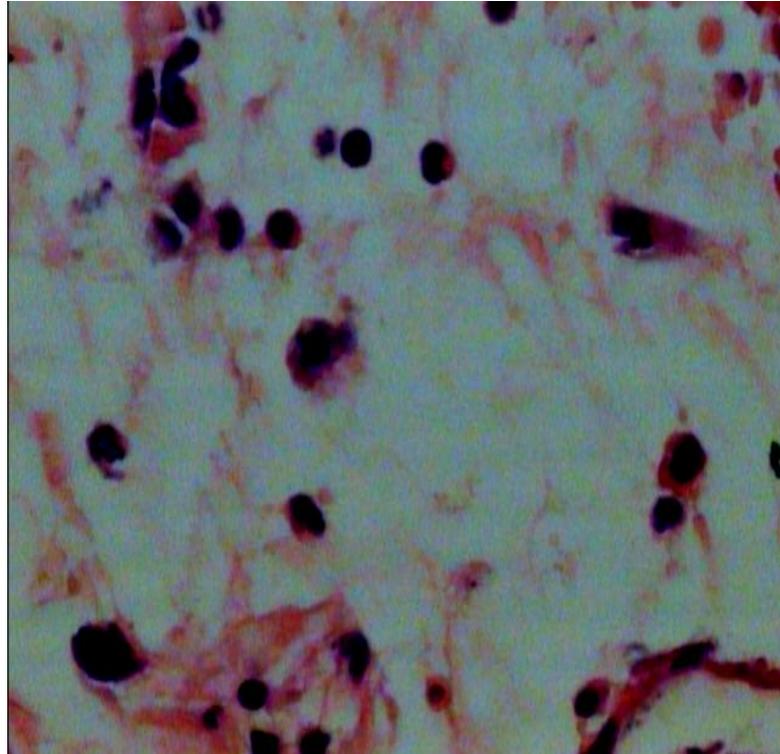
**Figura – 16** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto e edema acentuado. Coloração HE (100x).



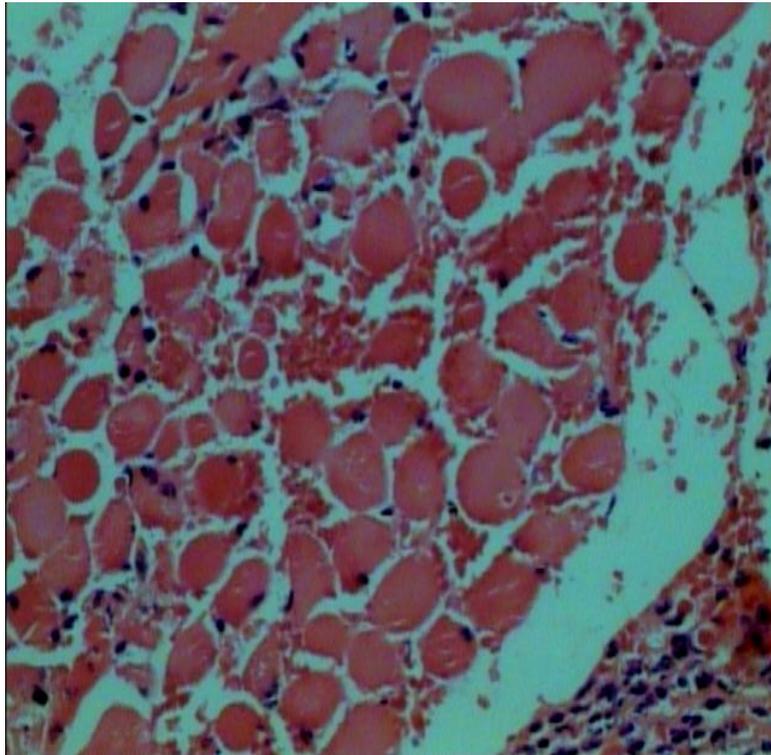
**Figura – 17** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório moderado, edema moderado e hemorragia acentuada. Coloração HE (100x).



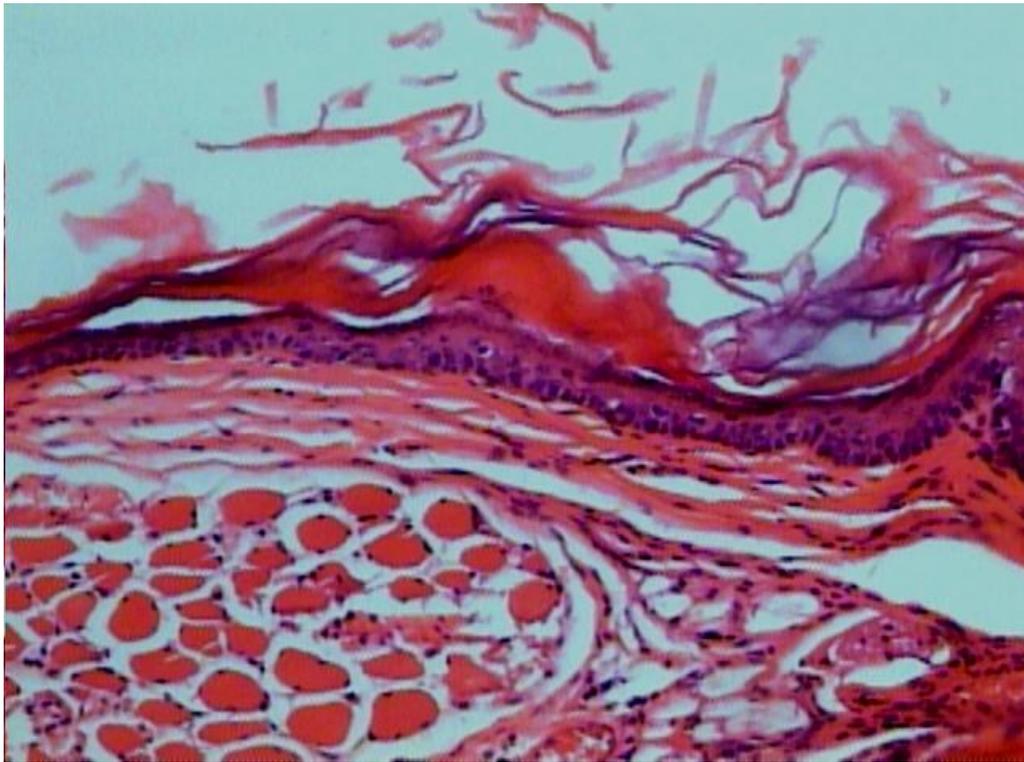
**Figura – 18** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo CONTROLE. Infiltrado inflamatório acentuado, congestão e hemorragia. Coloração HE (400x).



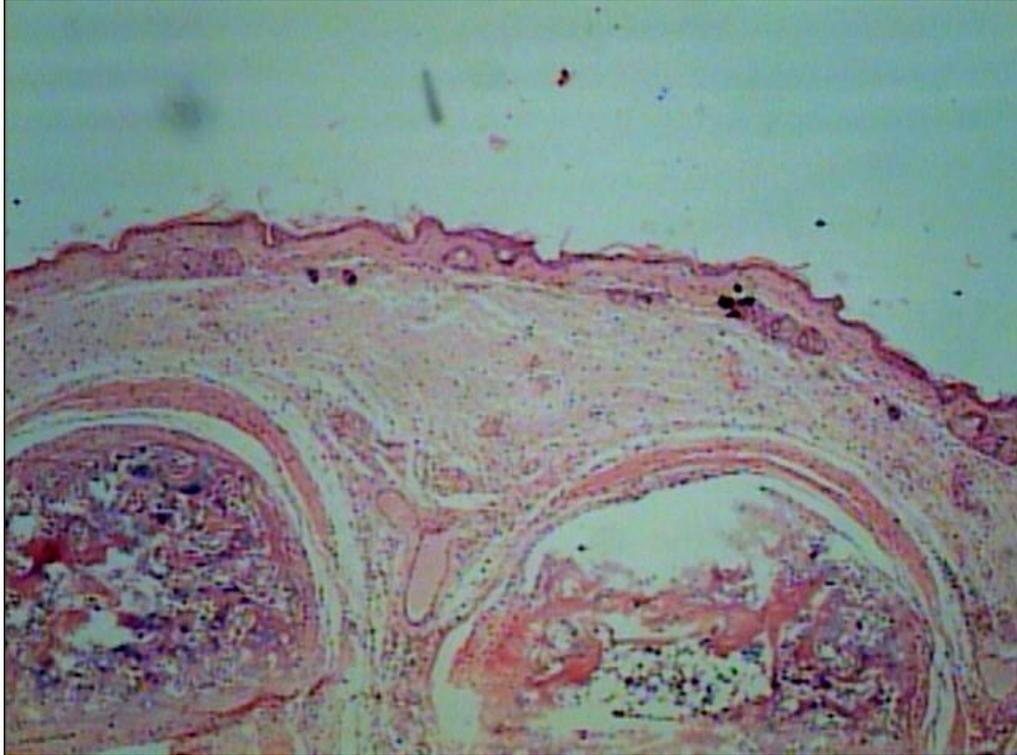
**Figura – 19** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto e edema moderado. Coloração HE (400x).



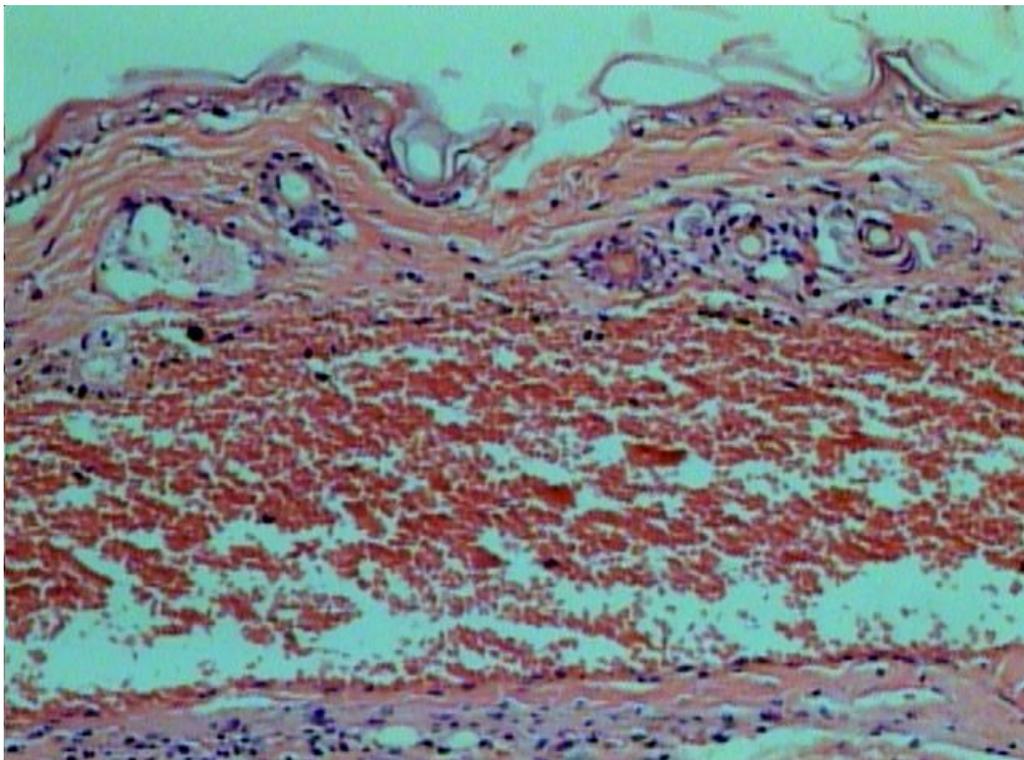
**Figura – 20** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto, edema discreto, hemorragia endomisial acentuada e miocitólise moderada. Coloração HE (400x).



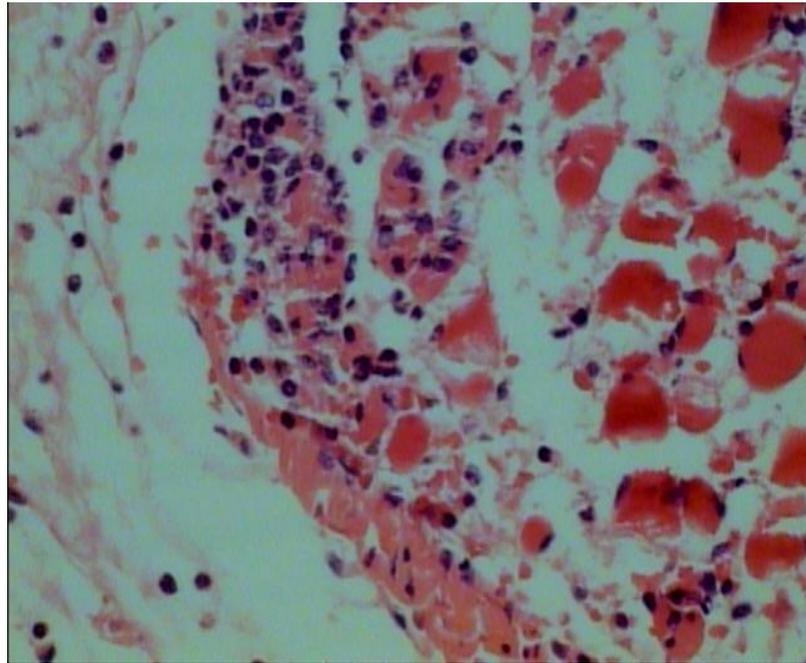
**Figura – 21** Corte transversal do coxim plantar da pata esquerda do camundongo, 3 horas após injeção injeção com solução salina (NaCl 0,9%) – Grupo CONTROLE. Músculo sem edema e sem hemorragia. Coloração HE (100x).



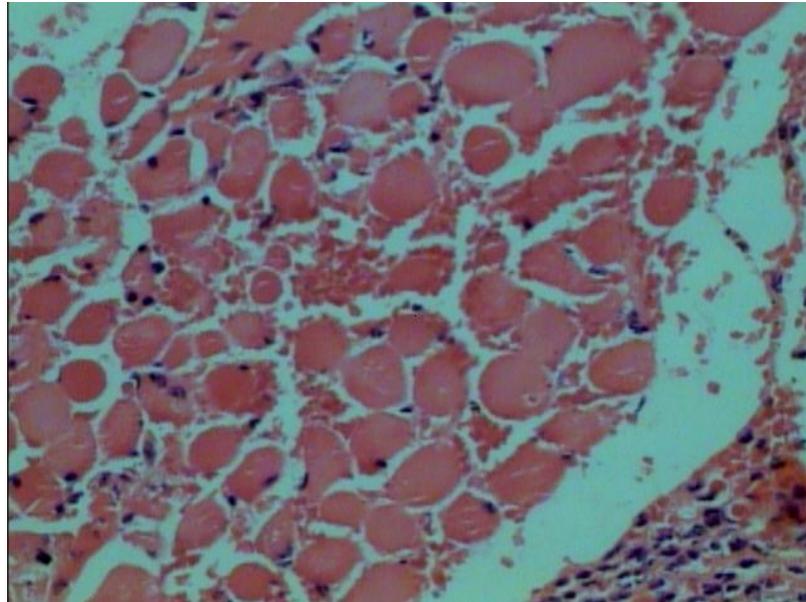
**Figura – 22.** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 12 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo CONTROLE. Edema discreto. Coloração HE (100x).



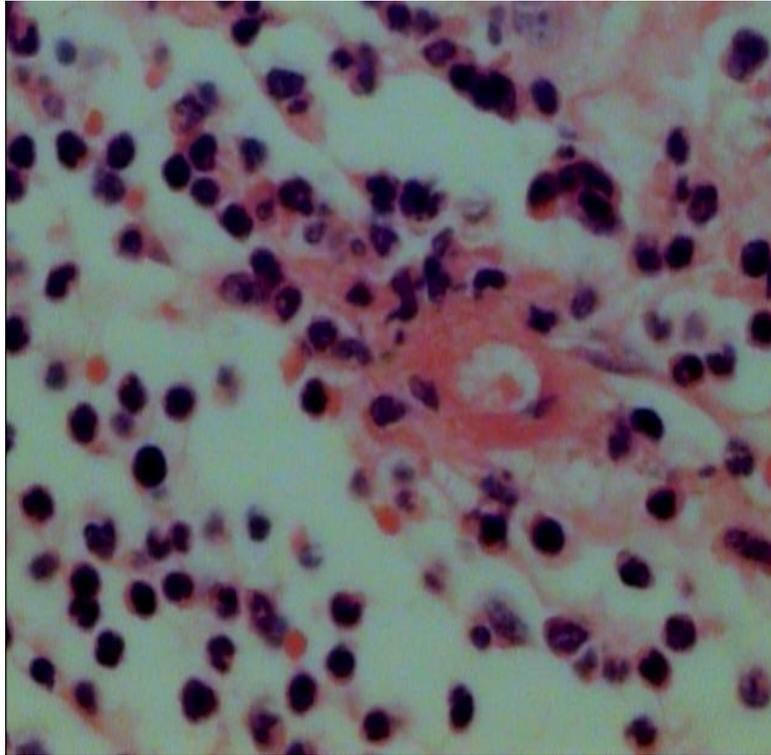
**Figura – 23** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 12 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL Edema discreto e hemorragia acentuada (difusa). Coloração HE (100x).



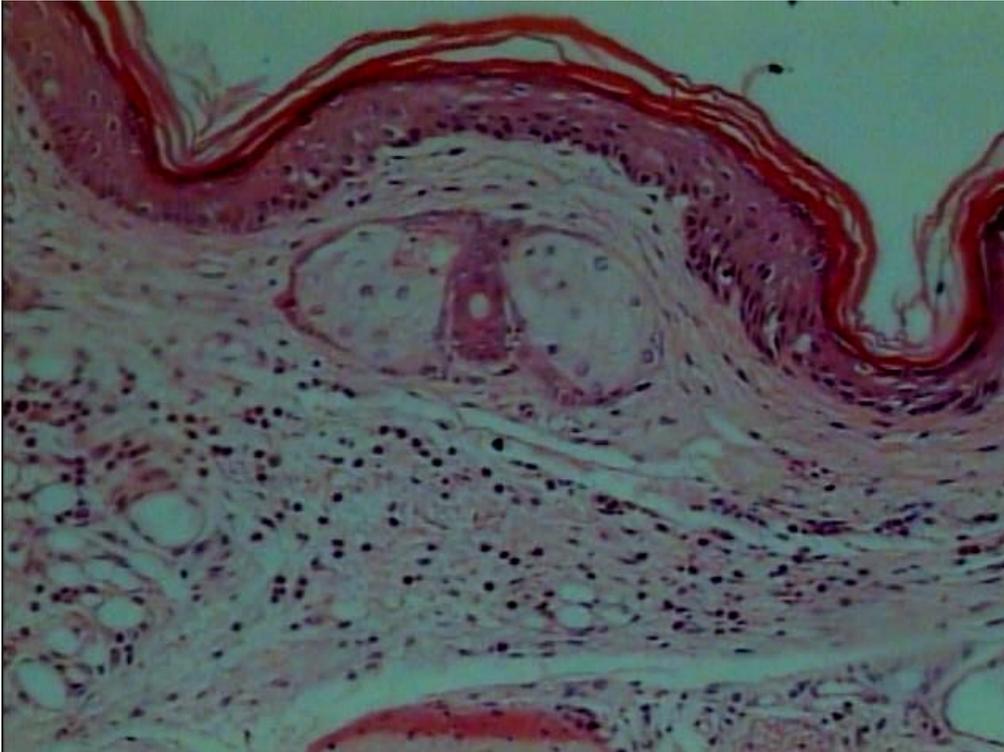
**Figura – 24** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 12 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo **CONTROLE**. Infiltrado inflamatório intramuscular moderado, edema moderado, hemorragia discreta e miocitólise moderada. Coloração HE (400x).



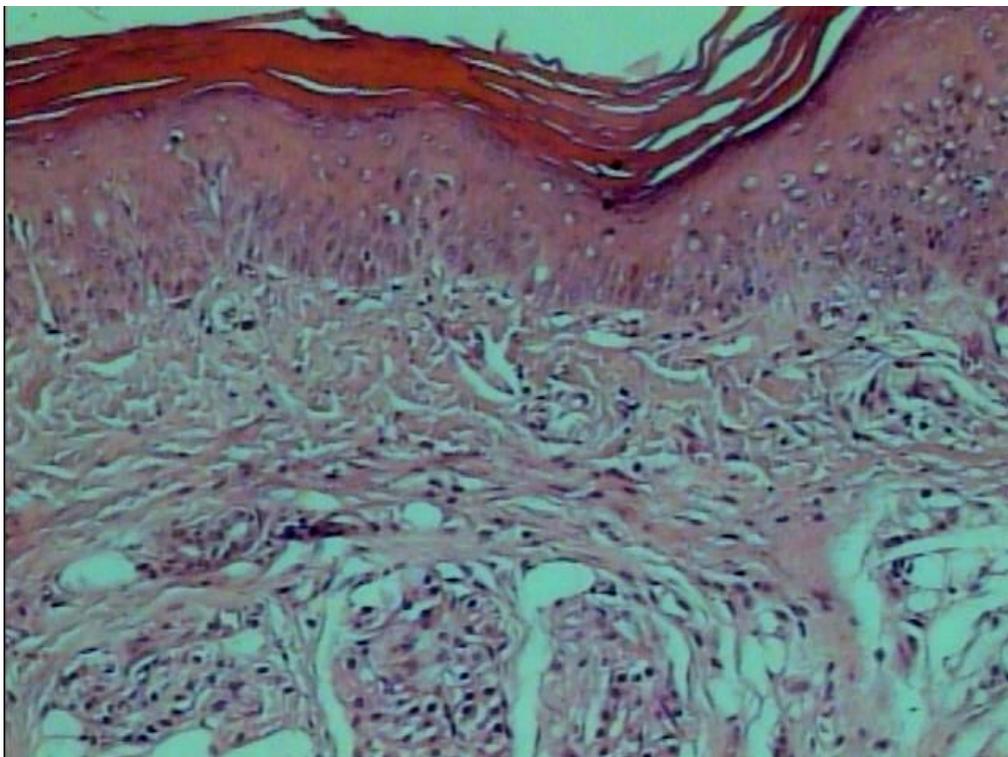
**Figura – 25** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 12 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo **EXPERIMENTAL**. Infiltrado inflamatório discreto, edema discreto, hemorragia endomisial acentuada e miocitólise moderada. Coloração HE (400x).



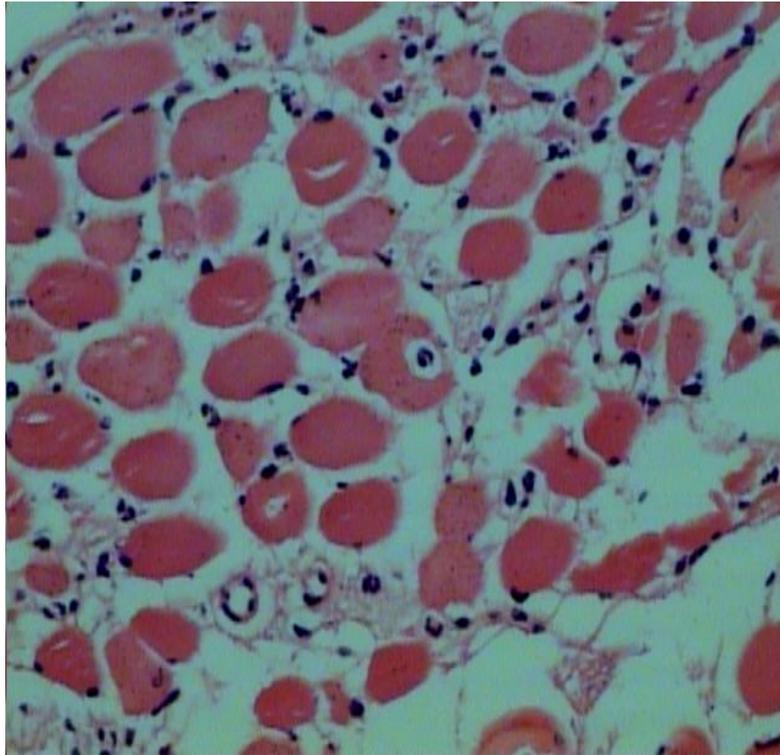
**Figura – 26.** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 12 horas após injeção com o veneno de *Bothrops atrox* (5 µg) – Grupo CONTROLE. 12 horas; Pata Direita. Infiltrado leucocitário acentuado, edema acentuado e hemorragia discreta. Coloração HE (400x).



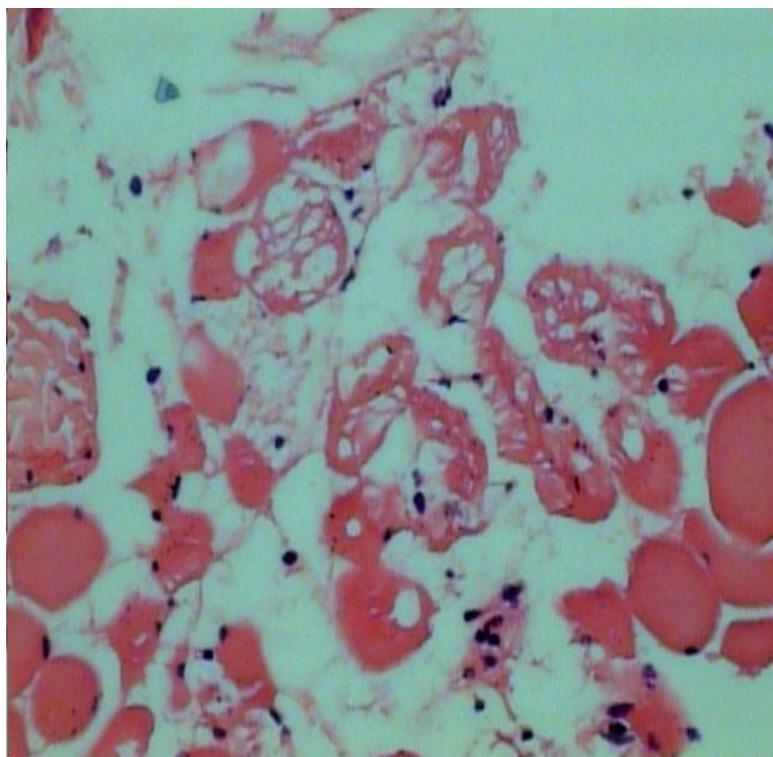
**Figura – 27** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* (5 µg) – Grupo CONTROLE. Infiltrado inflamatório discreto, edema moderado. Coloração HE (100x).



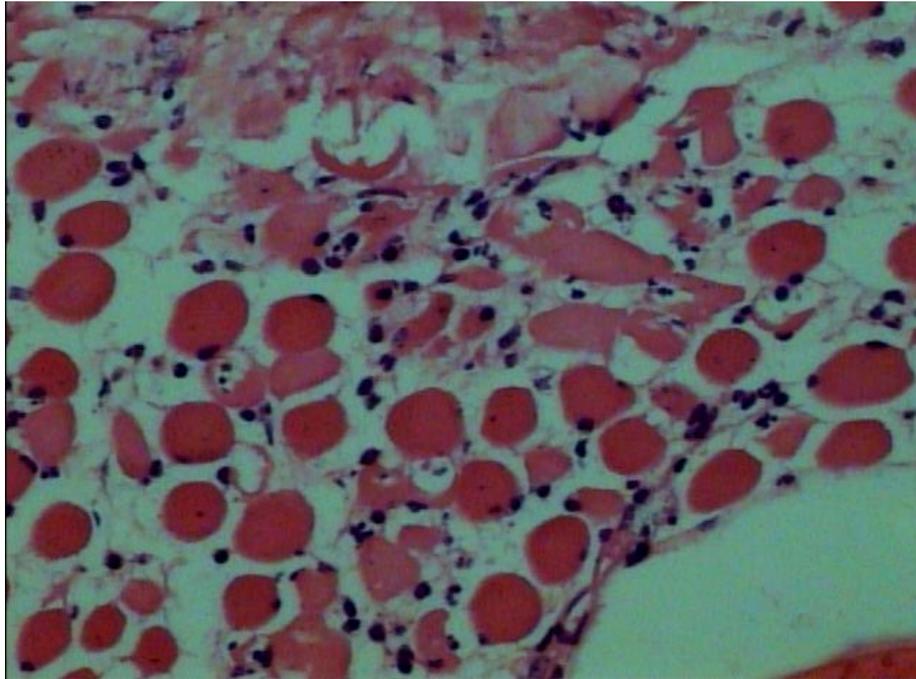
**Figura – 28** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 3 horas após injeção com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* (5 µg) – Grupo EXPERIMENTAL. Infiltrado inflamatório discreto, edema discreto. Coloração HE (100x).



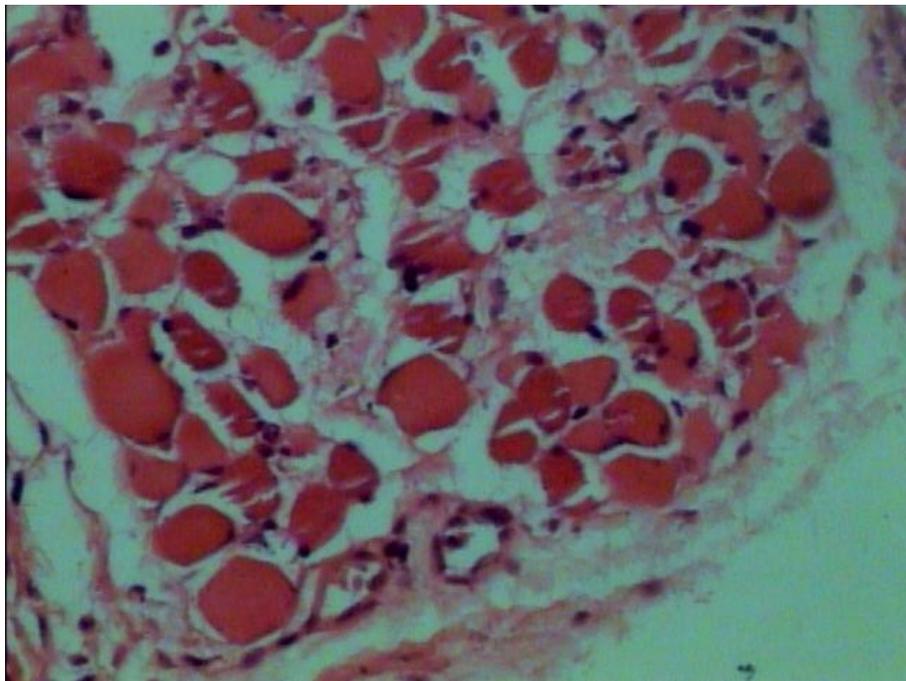
**Figura – 29** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 6 horas após injeção com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* (5 µg) – Grupo **CONTROLE**. Infiltrado inflamatório discreto; edema discreto; ausência de hemorragia; miocitólise discreta. Coloração HE (40x).



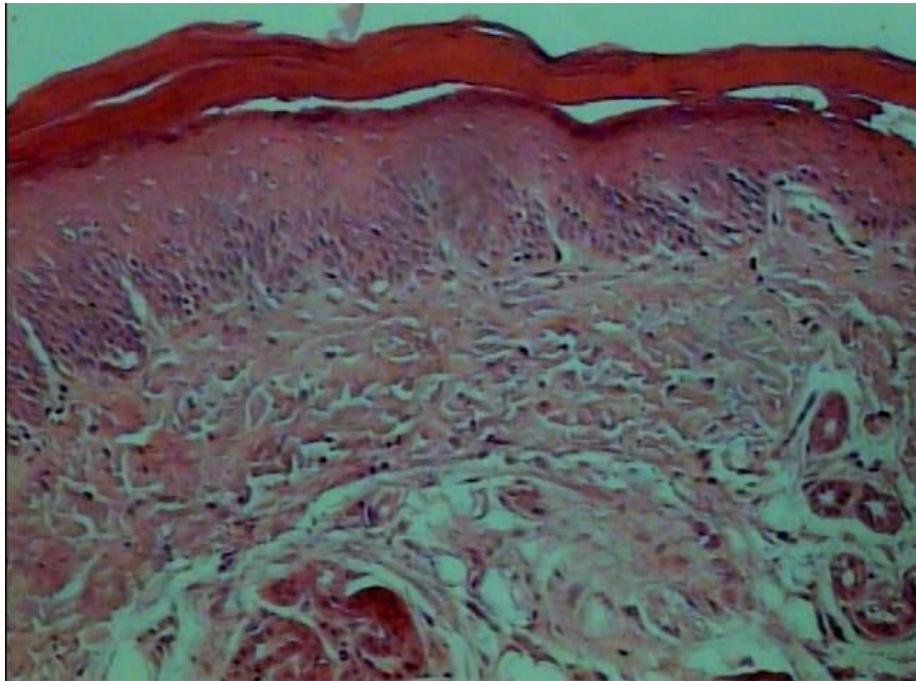
**Figura – 30** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 6 horas após injeção com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* (5 µg) – Grupo **EXPERIMENTAL**. Infiltrado inflamatório discreto; edema moderado; ausência de hemorragia; miocitólise acentuada com vacuolização das fibras musculares. Coloração HE (40x).



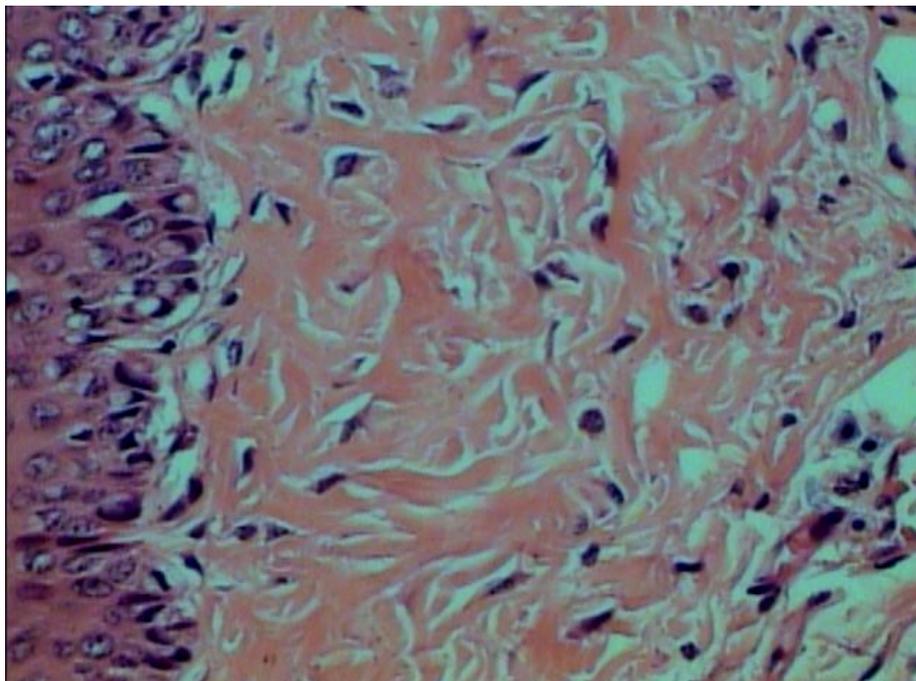
**Figura – 31** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 6 horas após injeção com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* (5 µg) – Grupo **CONTROLE**. Infiltrado inflamatório moderado; edema moderado; ausência de hemorragia; miocitólise moderada. Coloração HE (400x).



**Figura – 32** Corte transversal do coxim plantar da pata direita do camundongo, 6 horas após injeção com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* (5 µg) – Grupo **EXPERIMENTAL**. Infiltrado inflamatório discreto; edema discreto; ausência de hemorragia; miocitólise discreta. Coloração HE (400x).



**Figura – 33** Corte transversal do coxim plantar da pata esquerda do camundongo, 3 horas após injeção com solução salina (NaCl 0,9%) – Grupo CONTROLE. Ausência de infiltrado inflamatório, edema, hemorragia e miocitólise. Coloração HE (400x).



**Figura – 34** Corte transversal do coxim plantar da pata esquerda do camundongo, 6 horas após injeção solução salina (NaCl 0,9%) – Grupo EXPERIMENTAL. Ausência de infiltrado inflamatório, edema, hemorragia e miocitólise. Coloração HE (400x).

Na Amazônia os acidentes por serpentes peçonhentas são muito comuns, podendo ter seus efeitos locais e sistêmicos agravados com a demora no atendimento, uma vez que esse tipo de acidente normalmente ocorre em zonas rurais ou locais distantes dos centros que possuem o antiveneno. Os venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* induzem reação inflamatória local muito rápida, caracterizada por hemorragia, dor, mionecrose, edema e infiltrado leucocitário acentuado nos tecidos afetados. Embora a soroterapia seja imprescindível para a neutralização dos efeitos sistêmicos dos venenos, são necessárias pesquisas sobre inibidores naturais que possam neutralizar os efeitos locais do envenenamento ofídico.

Assim, o presente estudo visou ampliar os conhecimentos sobre o uso do óleo de andiroba, avaliando sua atividade sobre o processo inflamatório local induzido em camundongos, utilizando os venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, duas serpentes de grande importância na região da Amazônia.

Para a avaliação da toxicidade aguda e dos efeitos farmacológicos gerais do óleo de andiroba foi determinada a  $DL_{50}$  e foram realizados testes gerais de atividade farmacológica.

Neste modelo experimental, a dose letal do óleo de andiroba administrado via i.p. encontrada foi de  $200\mu\text{L}/20\pm 2$  g peso (ou 10 mL/kg peso).

Não foram observados efeitos de toxicidade aguda no grupo controle, que recebeu azeite de oliva via i.p. em nenhuma das doses avaliadas.

Quanto aos efeitos farmacológicos gerais do óleo de andiroba, foram observados os mesmos efeitos entre os grupos tratados (grupo I = óleo de andiroba não filtrado; grupo II = óleo de andiroba filtrado), não apresentando diferenças significativas entre os mesmos.

Um dos efeitos mais marcantes nos grupos experimentais tratados com o óleo de andiroba (filtrada e não filtrada) foi a presença de ptose palpebral, que ocorreu em alguns

casos acompanhada de secreção ocular com a maior dose administrada (200 $\mu$ L) sugerindo, de acordo com Carlini (1972), uma possível ação depressora no SNC pela presença de substâncias neurolépticas. A diminuição da atividade motora com o aumento das doses administradas vem reforçar essa possível ação depressora.

Não foi registrada a presença de contorções abdominais após administração do óleo de andiroba pela via i.p. em nenhuma das doses testadas por este modelo experimental. Esse resultado assemelha-se ao obtido por Santos *et al.* (2001), que observaram uma diminuição significativa no número de contorções abdominais induzida pelo ácido acético (1,2%) após administração do extrato aquoso das cascas de *Carapa guianensis* Aubl., sugerindo a presença de substâncias com atividade analgésica. Entretanto, Mitsugui *et al.* (2002a; 2002b) demonstraram que o extrato aquoso das cascas de *Carapa guianensis* não mostrou atividade analgésica ao estímulo nociceptivo induzido pelo calor.

Outro efeito importante foi a presença de discreta hemorragia na cavidade peritoneal nos grupos tratados com o óleo de andiroba (filtrada e não-filtrada) nas doses de 150 e 200 $\mu$ L.

Os resultados aqui obtidos contrastam com os de Penido *et al.* (2005a) que, utilizando doses do óleo de *Carapa guianensis* de 50 a 1000 mg/kg peso pela via oral (v.o.), não observaram toxicidade ou qualquer alteração no sistema nervoso central ou periférico. Isso pode ser justificado porque a via i.p. é uma via de absorção imediata, semelhante à via de absorção dos venenos de serpentes, permitindo que os efeitos de toxicidade do óleo de *Carapa guianensis* fossem observados mais rapidamente e provocando alterações sobre o sistema nervoso central.

Em relação à cinética da atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* (5  $\mu$ g via i.pl.) no grupo não-tratado, observou-se uma indução da atividade em 54,44% na primeira hora, obtendo-se um aumento máximo às 3 horas (66,09%) e diminuindo até

19,21% ao final das 24 horas observadas. Esses resultados assemelham-se aos encontrados por López-Lozano (1996) que obteve 65,88% da atividade logo na primeira hora, ao avaliar o efeito edematogênico induzido por 5 µg do veneno de *B. atrox*. Chacur (2000) também observou uma resposta máxima da atividade edematogênica (62%) na primeira hora, utilizando o veneno de *Bothrops jararaca* (5 µg via i.pl.).

Com relação ao grupo tratado com o óleo de andiroba (150µL via i.p.) foi capaz de inibir somente 33,93% de atividade edematogênica na primeira hora, diminuindo consistentemente até 0% de atividade ao final de 24 horas.

A cinética da atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Crotalus durissus ruruima* (5 µg via i.pl.) foi rápida e transitória. No grupo não tratado houve indução de 20,82% da atividade na primeira hora, com um aumento discreto de 24,50% às 3 horas e diminuído até 5,40% às 6 horas. Resultados semelhantes foram encontrados por MUNIZ (2000) utilizando venenos de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus terrificus*. Já no grupo tratado, a indução da atividade edematogênica foi bem menor, iniciando com 11,99% (1 hora) e diminuindo até 0% de atividade em apenas 6 horas, confirmando a sua ação rápida e transitória.

Diversas pesquisas relacionadas ao uso de plantas medicinais e seus constituintes vêm sendo realizadas em busca de novos fármacos. Nossos resultados demonstraram uma inibição significativa sobre o edema de pata induzido pelos venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* nos grupos tratados com o óleo de andiroba, observada já a partir da primeira hora em 37,67% e 42,41%, respectivamente. Houve um aumento gradativo da inibição ao longo das 24 horas.

Na avaliação histopatológica foram considerados os seguintes parâmetros com relação à atividade inflamatória: infiltrado inflamatório, edema, hemorragia e miocitólise. Dentre

esses, o infiltrado inflamatório foi o único que demonstrou inibição estatisticamente significativa nos grupos tratados com o óleo de andiroba pela via i.p. ( $p < 0,05$ ).

Nos grupos tratados (grupos experimentais) foi observada histologicamente uma redução expressiva no número de leucócitos e uma redução parcial no edema às 3 e 12 horas para o veneno de *Bothrops atrox* e às 3 e 6 horas para o veneno de *Crotalus durissus ruruima*, não havendo alterações significativas em relação à hemorragia ou a miocitólise, quando comparados aos grupos não-tratados (grupos controle).

Estudos anteriores têm demonstrado que as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são responsáveis por algumas das atividades inflamatórias dos venenos de serpentes, como a indução do edema e o recrutamento das células inflamatórias (LLORET; MORENO, 1993; CHAVES *et al.*, 1998; LANDUCCI *et al.*, 1998). Kanashiro *et al.* (2002) isolaram e caracterizaram duas PLA<sub>2</sub> do veneno de *B. atrox*: BaPLA<sub>2</sub>I e BaPLA<sub>2</sub>III, com massas moleculares de 15 kDa. Apesar de bioquimicamente diferentes, essas enzimas apresentaram marcantes atividades mionecrótica e edematogênica, além da capacidade de induzir a degranulação de mastócitos e liberar a enzima creatinaquinase (CK).

Outros estudos sugerem que as PLA<sub>2</sub> miotóxicas possam atuar no sarcolema, induzindo uma desorganização nos fosfolipídios, com o comprometimento da integridade da membrana celular, levando a alterações na permeabilidade celular e causando dano celular irreversível (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; LOMONTE *et al.*, 2003).

Várias citocinas estão envolvidas na migração leucocitária, dentre elas o TNF e a IL-1, produzidas por macrófagos teciduais, que atuam sobre vênulas pós-capilares adjacentes induzindo a expressão de várias moléculas de adesão, dentre elas a P-selectina e a E-selectina, que servirão como ligantes das integrinas e quimiocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Barros *et al.* (1998) sugerem haver vários mecanismos envolvidos na resposta inflamatória local produzida pelos venenos de *B. atrox*: a exsudação inicial seria mediada pela liberação local de bradicinina e histamina; a aderência e a migração celular pelos PMN seria desencadeada pela liberação de IL-8 e pelo sistema complemento ( $C_{3a}$  e  $C_{5a}$ ); a IL-8 mediaría o acúmulo de basófilos e linfócitos; as células endoteliais dos vasos sanguíneos, pela ação do veneno, poderiam ser ativadas e expressariam P-selectina e E-selectina sob ação parácrina da histamina, do fator trombina-like e do TNF- $\alpha$ ; a destruição das células musculares esqueléticas poderiam ser induzidas diretamente por enzimas (como proteases, fosfolipases  $A_2$ , hemorraginas ou outros componentes citolíticos do veneno) ou indiretamente por mediadores liberados pelos leucócitos.

Farsky *et al.* (1997) estudaram a resposta leucocitária do veneno de *Bothrops jararaca* e observaram que, *in vivo*, este veneno promoveu um infiltrado leucocitário no local da lesão logo após o envenenamento, por efeito indireto da liberação ou geração de mediadores endógenos; entretanto, o veneno por si só não foi capaz de influenciar a quimiotaxia, sendo esta atribuída à liberação dos mediadores leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Esses mediadores foram encontrados em altas concentrações 1 – 4 horas após a injeção do veneno de *Bothrops jararaca*.

Clissa (2002) mostrou a relação de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1b e IL-6 como sendo os mediadores presentes nos momentos iniciais da instalação do quadro local agudo ao estudar o efeito edematogênico induzido por *Bothrops jararaca*.

Diversos estudos demonstram a importância que as células do infiltrado inflamatório desempenham no dano tecidual local, assim como na reparação e regeneração tissular. Entretanto, estas células tendem a evoluir para a cronificação da resposta quando desencadeados por misturas complexas como os venenos de serpentes peçonhentas

(GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; FARSKY et al., 1997; BARROS et al., 1998; CLISSA, 2000; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; TEIXEIRA et al., 2003; 2005b).

Dados da literatura mostram que a persistência do infiltrado inflamatório de *per si* é um fator de agressão tissular (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; TEIXEIRA et al., 2003). Ao diminuir a exsudação dos leucócitos ou a quimiotaxia, o óleo de andiroba evitaria a ação lesiva tissular pelas células do infiltrado inflamatório.

Diferentemente, no presente estudo houve uma expressiva redução do infiltrado inflamatório nos grupos tratados com o óleo de andiroba, para ambos os venenos e em todos os intervalos de tempo analisados.

Recentemente, Penido *et al.* (2005a) demonstraram que o óleo de andiroba apresentou atividades anti-alérgica e anti-hiperalgésica, que foram também mimetizadas por seus limonóides ou tetranortriterpenóides (TNTP). Observaram que os efeitos deste óleo e seus derivados TNTP dependeram do bloqueio no mecanismo de sinalização exercidos pela histamina, bradicinina e fator ativador de plaquetas (PAF), os quais estimulam a formação de prostaglandina E<sub>2</sub>. (PGE<sub>2</sub>). Entretanto, o mecanismo molecular básico pelo qual o óleo de andiroba e seus TNTP exercem essas atividades ainda não foi esclarecido. Em estudo posterior, Penido et al. (2005b) verificaram que os TNTP isolados de sementes de andiroba (*Carapa guianensis*) foram capazes de inibir a produção dos mediadores eosinofílicos na cavidade pleural em camundongos, provavelmente pela inibição na síntese de quimiocinas eosinofílicas. Além disso, sugeriram que esses TNTP poderiam inibir outras quimiocinas que agem sobre os neutrófilos.

O sistema complemento também atua com um dos alvos dos venenos de serpentes. Rodrigues et al. (2004) verificaram que proteínas de baixo peso molecular presentes no veneno de *Bothrops atrox* ativam componentes do sistema complemento (C3a e C5a), levando

ao acúmulo de PMN, entretanto sem interferir na indução da hemorragia.

A formação do edema ocorre pela presença de metaloproteinases e fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas (PLA<sub>2</sub>) presentes nos venenos (GUTIÉRREZ, LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ, RUCAVADO, 2000). Essas enzimas promovem a liberação de aminas vasoativas (histamina e serotonina) pela degranulação dos mastócitos, bem como a liberação de ácido araquidônico dos fosfolípidios de membrana iniciando, assim, a via da síntese de prostaglandinas (LOMONTE *et al.*, 1993; CHAVEZ *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Vishwanath *et al.* (1996) sugerem que lipídios de plantas com estruturas moleculares diferentes aos lipídios substratos das PLA<sub>2</sub>, exercem ação inibitória sobre as PLA<sub>2</sub> ao se ligarem a essas enzimas impedindo a ligação de seus substratos no sítio catalítico dessas enzimas. Possivelmente os lipídios presentes no óleo de andiroba poderiam também apresentar atividades biológicas sobre o processo inflamatório local, inibindo as atividades enzimáticas das PLA<sub>2</sub> presentes nos venenos das serpentes estudadas.

Experimentalmente observa-se a formação do edema pela exsudação de proteínas plasmáticas; provocam ainda, uma resposta inflamatória celular marcante com influxo de leucócitos no local da lesão, predominando inicialmente os polimorfonucleares (PMN), geralmente neutrófilos, sendo gradativamente substituídos por mononucleares (MN) (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986; FLORES *et al.*, 1993; FARSKY *et al.*, 1997; BARROS *et al.*, 1998; ZAMUNÉR *et al.*, 2001).

Nossos resultados demonstraram discreta diminuição no edema ao serem avaliados histologicamente, sugerindo que princípios ativos do óleo poderiam atuar também inibindo processos moleculares e/ou celulares e edematizantes, induzidos por fatores intrínsecos ou pelas toxinas dos venenos de serpentes.

Em nosso estudo foi observada a presença de hemorragia acentuada em todas as patas dos camundongos que receberam o veneno de *Bothrops atrox*, tanto no grupo tratado como no não-tratado, sendo confirmada pela histopatologia. O óleo de andiroba não foi capaz de inibir a atividade hemorrágica deste veneno, provavelmente pela ausência de substâncias presentes no óleo de andiroba que não têm a capacidade de inibir os fatores hemorrágicos dos venenos das serpentes estudadas.

O mecanismo de indução da hemorragia local pelas metaloproteinases hemorrágicas tem sido amplamente estudado e constitui-se basicamente na degradação das proteínas da membrana basal dos capilares sanguíneos (BJARNASON; FOX, 1994; KAMIGUTI *et al.*, 1996; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Em estudo anterior, Anai *et al.* (2002) observaram que as hemorraginas provocam uma dispersão muito rápida dos componentes dos venenos *Bothrops jararaca* da área injetada para a circulação.

Conforme trabalhos descritos anteriormente (FERREIRA, 1990; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2003), a mionecrose induzida por venenos de serpentes da família Viperidae pode ocorrer ou pela ação direta das miotoxinas (metaloproteinases miotóxicas) sobre as membranas plasmáticas das células musculares, levando à lesão irreversível, ou pela isquemia desencadeada em consequência da trombose e da hemorragia que levam à da compressão tissular e outras alterações inflamatórias.

Em nosso estudo, a mionecrose não se mostrou tão expressiva pelo modelo do edema de pata, provavelmente porque a extensão muscular avaliada foi muito pequena. O ideal seria avaliar a mionecrose após inoculação i.m. dos venenos no músculo gastrocnêmio, assim como o acompanhamento da creatinaquinase (CK).

A miotoxicidade induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* foi mais marcante, em relação ao veneno de *Crotalus durissus ruruima*. Foi observada a presença de moderada

miocitólise. Dados semelhantes foram encontrados por Nuñez *et al.* (2004), que ao estudarem a miotoxina I do veneno de *Bothrops atrox* observaram a indução de dano local rápido sobre o tecido muscular esquelético e moderado edema.

No que diz respeito ao infiltrado inflamatório e ao edema induzidos pelos venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, é possível que a atividade inibitória do óleo de andiroba sobre os efeitos inflamatórios locais poderia ser devido à atuação de seus tetranortriterpenóides (TNTP) sobre a produção e/ou modulação da atividade de citocinas e quimiocinas, desta forma inibindo-as e/ou impedindo a migração leucocitária.

O mecanismo ainda não pode ser estabelecido por tratar-se de um quadro inflamatório local bastante complexo. Sugere-se aqui que os componentes do óleo de andiroba (principalmente seus TNTP) poderiam estar interferindo no processo de quimiotaxia, impedindo a migração leucocitária pelo bloqueio/inibição de alguns dos mediadores pró-inflamatórios como o TNF e IL-1; o componente C5a do sistema complemento; os produtos do metabolismo do ácido araquidônico, como LTB<sub>4</sub> e TXA<sub>2</sub> (figura 35).

O fato do óleo de andiroba não ter conseguido atuar de forma a inibir a hemorragia ou a miocitólise pode ser justificada pela rápida instalação do dano tecidual local após a inoculação do veneno.

Estudos posteriores para estabelecer os princípios ativos e o(s) provável(eis) mecanismo(s) de ação sobre os mediadores pró-inflamatórios envolvidos na inflamação local induzida pelos venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados ao processo inflamatório local induzido por essas serpentes. Além disso, poderia servir como alvos de estudos futuros, visando modular a resposta inflamatória para um processo de atenuação dos sintomas locais observados pelos venenos das serpentes amazônicas.

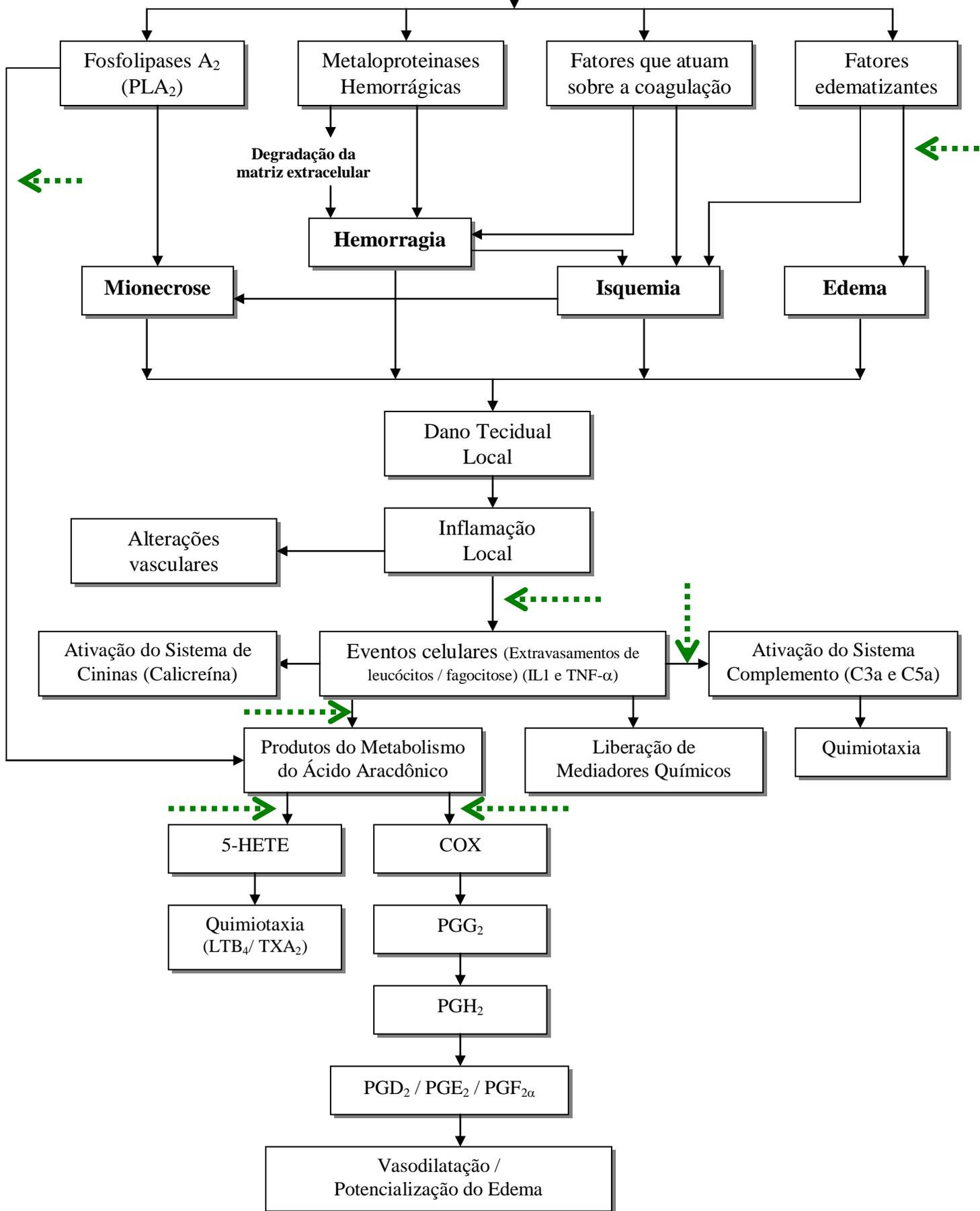


Figura 35 – Prováveis locais de atuação (setas pontilhadas) dos compostos do óleo de andiroba no processo inflamatório local induzidos pelos venenos de serpentes da família Viperidae.

FONTE: Adaptado de Gutiérrez: Lomonte. 2003; KUMAR et al.. 2005.

## 5 CONCLUSÕES

Com o modelo experimental empregado neste estudo foi possível concluir que:

- ◆ O óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) administrado via i.p. apresentou efeitos de toxicidade aguda nas doses de 150 e 200µL/20±2g peso, destacando-se a presença de ptose palpebral e secreção ocular, além de discreta hemorragia intraperitoneal.
- ◆ Quanto ao edema avaliado pela medição do diâmetro das patas dos camundongos, foi observada uma diminuição significativa em 37,67% no edema induzido pelo veneno de *Bothrops atrox* e em 42,41% no edema induzido pelo veneno de *Crotalus durissus ruruima*, a partir da primeira hora após a administração desses venenos nos grupos tratados com o óleo de andiroba.
- ◆ A análise histopatológica demonstrou uma diminuição significativa no infiltrado inflamatório de 87,03% e 82,10%, às 3 e 12 horas, respectivamente, após o tratamento com o óleo de andiroba nas patas experimentais induzidas com o veneno de *Bothrops atrox*. Quanto ao edema, houve redução em 29,18% e 32,55% às 3 e 12 horas, respectivamente.
- ◆ Na indução com o veneno de *Crotalus durissus ruruima* também foi demonstrada pela histopatologia uma diminuição significativa no infiltrado inflamatório de 89,37% e 75,60%, às 3 e 6 horas, respectivamente, após o tratamento com o óleo de andiroba. A redução do edema foi marcante às 3 horas (30,87%).
- ◆ Nem a hemorragia e nem a miocitólise foram inibidas significativamente pelo óleo de andiroba administrado pela via intraperitoneal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Citocinas. In: .\_\_\_\_\_. (eds.) **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2005. p. 251-282.
- ABUBAKAR, M.S.; SULE, M.I.; PATEH, U.U.; ABDURAHMAN, E.M.; HARUNA, A.K.; JAHUN, B.M. In vitro snake venom detoxifying action of the leaf extract of *Guiera senegalensis*. **J. Ethnopharmacology**, v. 69, p. 253–257, 2000.
- ACHSTETTER, V.A. Microtomy. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. (eds) **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 45-52, cap. 8, 1994.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de produtos fitoterápicos**. D. O. U. de 07/11/2003.
- ALAM, M.I.; GOMES, A. Snake venom neutralization by Indian medicinal plants (*Vitex negundo* and *Emblica officinalis*) root extracts. **J. Ethnopharmacology**, v. 86, p. 75-80, 2003.
- ALLEN, T.C. Hematoxylin and Eosin. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. (eds) **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 53-58, cap. 9, 1994.
- AMARAL, C.F.; MAGALHÃES, R.A.; de REZENDE, N.A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 33 (4):251-255. 1991.
- ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, p.63-68. 2002.
- ANDRADE, E.H.; ZOGHBI, M.D.; MAIA, J.G. Volatiles from leaves and flowers of *Carapa guianensis* Aubl. **J. Essential Oil Research**, v. 13, n. 6, p. 436-438. 2001.
- ARAGÓN, F., GUBENSEK, F. *Bothrops asper* from Atlantic and Pacific zones od Costa Rica. **Toxicon**, v. 19, p. 797-805. 1981.
- ASUZU, I.U.; HARVEY, A.L. The antisnake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract. **Toxicon**, v. 42, p. 763–768, 2003.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J.L. C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. (eds.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clinica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 91-98, 2003.
- BARAMOVA, E.N., SHANNON, J.D., BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 275, n. 1, p.63-71. 1989.

- BARROS, S.F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators of Inflammation**, v. 7, p.339-346, 1998.
- BENVENUTI, L.A. Anatomia patológica nos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J.L. C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. (eds.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 347-355, 2003.
- BIONDO, R.; PEREIRA, A.M.S; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie**, v. 85, p. 1017–1025, 2003.
- BJARNASON, J.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins snake venoms. **Toxin Review**, v. 7, p. 121-209. 1994.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos cem anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7-16. 2003.
- BOLAÑOS, R. **Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centro America**. San José: Editora Universitaria de Costa Rica. 210 p. 1984.
- BORGES, C. C.; SADAHIRO, M.; DOS-SANTOS, M. C. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. **Rev. Soc. Bras. Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 637-646. 1999.
- BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANCESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Caesaria sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, p. 1863-1869. 2001.
- BORGES, M.H.; ALVES, D.L.F.; RASLAN, D.S.; PILÓ-VELOSO, D.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; DE LIMA, M.E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **J. Ethnopharmacology**, v. 98, p. 21-29. 2005.
- BOUFLEUER, N. T., KAGEYAMA, P. Y., OLIVEIRA, A.M.A., LACERDA, C. **Usos do óleo de *Carapa guianensis* Aublet (andiroba) por comunidades tradicionais do Alto e Médio Rio Gregório**, Tarauacá-AC. 54º. Congresso Nacional de Botânica (Resumos), Belém, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília, 131 p. 1998a.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Produtos Potenciais da Amazônia: andiroba**. Brasília, 37 p. 1998b.
- BRASIL. Ministério da Saúde – Portal da Saúde. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21924](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21924) Acesso em: 16 agosto. 2005.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. Cornell University, New York, 1989. 425 p.

CARDOSO, J. L. Ofidismo. Aracneísmo. Escorpionismo. Epidemiologia. Patogenia e Clínica. Diagnóstico e Terapêutica. In: SOERENSEN, B. (ed.) **Animais Peçonhentos Reconhecimento. Distribuição Geográfica. Produção de Soros. Clínica e Tratamento dos Envenenamentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 109-138. 1990.

CARLINI, F.A. Screening farmacológico de plantas brasileiras. **Rev. Bras. Biol.**, v. 32, n. 2, p. 265-274. 1972.

CARNEIRO, A.S.; RIBEIRO, O.G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W.H.K.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBÁÑEZ, O.M.; STAROBINAS, N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v. 40, p. 1571-1579. 2002.

CASTRO, O.; GUTIÉRREZ, 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. **Rev. Biol. Tropical**, v. 47, n. 3, p. 605-616. 1999.

CASTRO, K.N.C; CARVALHO, A.L.O.; ALMEIDA, A.P.; OLIVEIRA, D.B.; BORBA, H.R.; COSTA, S.S.; ZINGALI, R.B. Preliminary in vitro studies on the *Marsypianthes chamaedrys* (boia-caá) extracts at fibrinoclotting induced by snake venoms. **Toxicon**, v. 41, p. 929-932, 2003.

CHACUR, M. **Mediação química da hiperalgesia induzida pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* e por uma miotoxina com atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de *Bothrops asper***. 2000. 92p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHAMPAGNE, D.E.; KOUL, O.; ISMAN, M.B.; SCUDDER, G.G.E.; TOWERS, G.H.N. Biological activity of limonoids from the Rutales. **Phytochemistry**, v. 31, p. 377-394. 1992.

CHAVEZ, F., BARBOSA, M., GUTIÉRREZ, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**, v. 33, p. 31-39. 1995.

CHAVEZ, F.; LEÓN, G.; ALVARADO, V.H.; GUTIÉRREZ, J.M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 36, p. 1861 – 1869. 1998.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 823-846. 1998.

CLISSA, P.B. **Caracterização do efeito da jararagina sobre a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo murino**. 2002. 123 p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.

DINIZ, C.R. Plantas medicinais e picadas de serpentes. **Ciência Hoje**, v. 6, n. 35, p. 76-77. 1987.

DOS-SANTOS, M.C.; FERREIRA, L.C.L.; DIAS-DA-SILVA, W.; FURTADO, MFD. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos “amarillo” y “blanco” de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*: poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 31, p. 1459-1469, 1993.

- FARSKY, S.H.P.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURRY, Y.; TEIXEIRA, C.F.P. Leucocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 185-193. 1997.
- FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 4, p. 647-661, 2002.
- FERREIRA, L.C.L. **Estudo experimental das alterações histopatológicas, locais e sistêmicas, e da coagulação induzidas pelo veneno da *Lachesis muta muta* em coelhos e cães.** 1990. 66 p. Tese (Doutorado em Anatomia Patológica Médica) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FERREIRA, M.L.; MOURA DA SILVA, A.M.; MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **Toxicon**, v. 30, p. 1591-1602, 1992.
- FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.
- FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxigenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, v. 31, p.1551-1559. 1993.
- FRANÇA, F.O.S.; FAN, H.W. Acidente botrópico. In: SCHWARTZMAN, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, p. 149-160, 1992.
- FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J.L. C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. (eds.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 72-86, 2003.
- FURTADO, M.F.D.; COLETTI, G.M.D.D.; DIAS-DA-SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos e dos correspondentes antivenenos. **Mem. Inst. Butantan**, v. 53, n. 2, p. 149-159. 1991.
- GREENCOTTAGE: Oils and butters. Andiroba oil. <http://www.greencottage.com/oils/andiroba.html>  
Acesso em: 02/11/04 às 21:00 h.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. **Rev. Biol. Trop.**, v. 28 n. 2, p. 341-351. 1980.
- GUTIÉRREZ, J. M.; GENE, J.A.; ROJAS, E.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 23, p. 887-893, 1985.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. **Toxicon**, v. 33, p. 1403-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1403-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M., LEÓN, G., ROJAS, G., LOMONTE, B., RUCAVADO, A., CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venoms. **Toxicon**, v. 36, n.11, p. 1529-1538. 1998.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in pathogenesis of local tissue damage. **Biochemie**, v. 82, p. 841-850. 2000.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico em América Latina. In: CARDOSO, J.L. C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. (eds.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 310-333, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915–931, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1001. 2005.

HALL, J. Embedding. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. (eds) **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 39-43, cap. 7, 1994.

HAMMER, M.L.A.; JOHNS, E.A. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil). **J. Ethnopharmacology**, v. 40, p. 53-75, 1993.

HOGUE, A. R.; ROMANO HOGUE, S.A.R.W.L. Sinopse das Serpentes Peçonhentas do Brasil. 2. ed. **Mem. Inst. Butantan**, v. 42/43, p. 373-497. 1978/1979.

IMTM. **Boletim do Núcleo de Epidemiologia e Saúde Pública**. Instituto de Medicina Tropical de Manaus, v.1, n. 3, p. 3. 1995.

IZIDORO, L.F.M.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES, R.S.; FERRO, E.V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie**, v. 85, p. 669–675, 2003.

JAIN, R.; AHMAD, M.; LIMAYE, D. Anti-inflammatory principles from natural sources. **Hamdard**, v. 36, n. 3, p. 16-27, 1993.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; THEAKSTON, R.D.G; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627-642. 1996.

KANASHIRO, M.M.; ESCOCARD, R.C.M.; PETRTSKI, J. H.; PRATES, M. V.; ALVES, E. W.; MACHADO, O. L. T.; SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. Biochemical and biological properties of phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops atrox* snake venoms. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1179–1186, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.. FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: \_\_\_\_\_. (eds.) **Robbins & Cotran: Patologia estrutural e funcional**. 7. ed. São Paulo: Elsevier Editora, 2005. p. 49-89.

LAGO, R. C. A.; SIQUEIRA, F. A. R. Composição química dos óleos de pracaxí e andiroba. **Bol. Técnico do Centro de Tecn. Agrícola Alimentar (CTAA)**, n. 14, p. 1-16, 1980.

LANDUCCI, E.C.T.; CASTRO, R.C.; PEREIRA, M.F.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. **European Journal of Pharmacology**, v. 343, p. 257–263, 1998.

LEÓN, G., VALVERDE, J.M., ROJAS, G., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 38, p. 233-244. 2000.

LLORET, S.; MORENO, J.J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A<sub>2</sub> purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, v. 31, p. 949-956. 1993.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; SOUZA, A.O.; CRUZ-HÖFLING, M.A., FLORES, C.A.; BON, C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, v. 38, p.209-221, 2000.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, p. 93-105. 1993.

LÓPEZ-LOZANO, J.L. **Atividade antiofídica de *Swartzia corrugata* Benth: química e farmacologia**. 1996. 157p. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

LÓPEZ-LOZANO, J.L. **Venenos de serpentes da Amazônia: propriedades e relações moleculares, fisiológicas e taxonômicas**. 2002. 170p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

LÓPEZ-LOZANO, J. L.; SOUZA, M.V.; RICART, C. A.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; SANCHEZ, E.F.; MUNIZ, E. G.; BÜHRNHEIM, P. F.; MORHY, L. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 40, p. 997-1006. 2002.

LUCAS, A.C.S. **Contribuição ao estudo químico de plantas da Amazônia: *Carapa guianensis* Aubl. e *C. procera* D.C. (Meliaceae)**. 1993. 91p. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

MALONE, M.H. Pharmacological approaches to natural products, screening and evaluation. In: WAGNER, H.; WOLF, P. **New natural products and plants drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin, Springer-Verlag, p. 23. 1977.

MARAGANORE, J.M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KÉDZY, F.J.; HENDRIKSON, R.L. A new class of phospholipase A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49: functional consequences for calcium and substrate binding. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p.13839-13843. 1984.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p.1749-1800. 1998.

MARTINBOROUGH, T. Karaba oil (Crabwood oil): a literature review. In: *Winners and Losers, Final Technical Report, 2003 FRP R7795*: Iwokrama International Centre for Rain Forest Conservation and Development, Georgetown. Appendix 4.1, 2003. 6 p.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1131-1142, 1992.

- MARUYAMA, M., TANIGAWA, M., SUGIKI, M., YOSHIDA, E., MIHARA, H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in hemorrhage. **Toxicon**, v.30, n. 11, p. 1387-1397. 1992.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas no Brasil. In: CARDOSO, J.L. C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. (eds.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 33-61, 2003.
- MENDONÇA, A. P. **Potencialidades e produção do óleo de andiroba (*Carapa procera* D.C. e *Carapa guianensis* Aubl.) no Estado do Amazonas**. 2004. 111 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional). Universidade do Federal do Amazonas, Manaus.
- MICHALANY, Jorge. Descalcificadores. In: \_\_\_\_\_. **Técnica histológica em anatomia patológica. Com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 3.ed. São Paulo: Michalany, 1998. p. 51-53.
- MILLS, B. Specimen orientation. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. (eds) **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 33-37, cap. 6., 1994.
- MINTON, S.A.; WEINSTEIN, S.A. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Toxicon**, v. 24, p. 71-80. 1986.
- MIOT, H.A.; BATISTELLA, R.F.; BATISTA, K.A.; VOLPATO, D.E.C.; AUGUSTO, L.S.T.; MADEIRA, N.G.; HADDAD Jr., V.; MIOT, L.D.B. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes* sp. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 46, n. 5, p.253-256. 2004.
- MITSUGUI, C.S.; SANTOS, A.L.; COSTA, E.A.; CASTRO, M.S.A.; LIMÃOS, E.A.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Avaliação da atividade antiedema e antinociceptiva do extrato aquoso de *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba). In: Resumos do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, FT227. Cuiabá. 2002a.
- MITSUGUI, C.S.; SANTOS, A.L.; COSTA, E.A.; CASTRO, M.S.A.; LIMÃOS, E.A.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C. Estudo da atividade antinociceptiva do extrato aquoso de *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba). In: Resumos do XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 2002. Águas de Lindóia. p. 200, 2002b.
- MORS, W.B. Plants active against snake bite. **Economic and Medicinal Plant Research**, v. 5, p. 353-373. 1991
- MORS, W.B.; NASCIMENTO, M.C.; PEREIRA, B.M.R.; PEREIRA, N.A. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-642. 2000.
- MOURA DA SILVA, A.M.; LAING, G.D.; PAINE, M.J.I.; DENNISON, J.M.T.J.; POLITI, V.; CRAMPTON, J.M.; THEAKSTON, R.D.G. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 9, p. 2000-2005. 1996.
- MULHOLLAND, D.A.; PAREL, B.; COOMBES, P.H. The Chemistry of the Meliaceae and Ptaeroxylaceae of Southern and Eastern Africa and Madagascar. **Current Organic Chemistry**, v. 4, p. 1011-1054, 2000.

MUNIZ, E. G. **Veneno de *Crotalus durissus ruruima*: propriedades moleculares, farmacológicas e imunológicas**. 2002. 80 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Federal do Amazonas, Manaus.

NASCIMENTO, S.P. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos no estado de Roraima, Brasil, entre 1992 e 1998. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 16, p. 271-276. 2000.

NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon**, v. 44, p. 91-101. 2004.

NÚÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L.A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops* snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v. 66, p.1017-1025, 2005.

OLIVEIRA, C.Z.; MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO, M.V.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia fortificata* against snake venoms, **J. Ethnopharmacology**, v. 98, p. 213-216. 2005.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; OSORIO, R.G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venoms. **J. Ethnopharmacology**, v.73, p.233-241. 2000.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.M.; MESA, J.B.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; ARANGO, J. L.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; RODRÍGUEZ, L.M.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; GÓMEZ, L.M.; URIBE, F.L.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, p. 1107-1114. 2002.

OWNBY, C.L.; COLBERG, T.R.; ODELL, G.V. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. **Toxicon**, v. 22, p. 227-233. 1984.

PENIDO, C.; COSTA, K.A.; PENNAFORTE, R.J.; COSTA, M.F.S.; PEREIRA, J.F.G.; SIANI, A.C.; HENRIQUES, M.G.M.O. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflammation Research**, v. 54, p. 295–303. 2005a.

PENIDO, C.; COSTA, K.A.; COSTA, M.F.S.; GUILHERMINO, J.F.; SIANI, A.C.; HENRIQUES, M.G.M.O. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NFκB activation. **International Immunopharmacology, Artigo em correção**. 2005b.

PENNINGTON, T.D.; STYLES, B.T.; TAYLOR, D.H.A. Meliaceae. **Flora Neotropica**, v. 28, p. 406-418. 1981.

PEREIRA, J. F. G. **Estudo químico e biológico de *Carapa guianensis* Aubl.** 1998. 262p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) Universidade do Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- PEREIRA, J.F.G.; TEIXEIRA, D.; MAZZEI, J.L.; GILBERT, B. Characterization of the chemical constituents of *Carapa guianensis* Aublet by HPLC-DAD. **Boll. Chim. Farmaceutico**, v. 138, p. 177. 1999.
- PITHAYANUKUL, P.; LAOVACHIRASUWAN, S.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRI, R. Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom. **J. Ethnopharmacology**, v. 90, p. 347–352, 2004.
- PROPHET, E.B. Fixation. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. (eds) **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 25-28, cap. 4, 1994a.
- PROPHET, E.B. Tissue Processing: Dehydration, Clearing, and Filtration. In: PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. (eds.) **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 29-31, cap. 5, 1994b.
- QI, S.H.; WU, D.G.; MA, Y.B.; LUO, X.D. A novel flavane from *Carapa guianensis* Aubl. **Acta Botanica Sinica**, v. 45, p. 1129-1133, 2003.
- QI, S.H.; WU, D.G.; ZHANG, S.; LUO, X.D. Constituents of *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Die Pharmazie**, v. 59, p.488-490, 2004.
- RAINTREE NUTRITION: **Tropical Plant Database. Andiroba** (*Carapa guianensis*) <http://www.rain-tree.com/andiroba.htm> Acesso em: 04/05/2005 às 10:18 h.
- REVILLA, J. Andiroba. In: \_\_\_\_\_. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. Manaus: SEBRAE/AM. p. 317-320. 2000.
- REYES-CHILPA, R.; ESTRADA, M.J. Química de las plantas alexíteras. **Interciencia**, v. 20, p.257-264, 1995.
- RODRIGUES, F.G.; PETRETSKI, J.H.; KANASHIRO, M.M.; LEMOS, L.; SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low molecular proteinase. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 1149-1156. 2004.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E.E.; DEULOFEU, V. (eds) **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, p. 345-841, 1971.
- RUSSELL, F.E.; WALTER, F.G.; BEY, T.A.; FERNANDEZ, M.C. Snakes and snakebite in Central America. **Toxicon**, 35: 1469-1522, 1997.
- SALDARRIAGA, M.M., OTERO, R.; NUÑEZ, V.; TORO, M.F., DÍAZ, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms in Colômbia. **Toxicon**, v. 42, p. 405-411. 2003
- SANTOS, A.L.; MITSUGUI, C.S.; CASTRO, M. S. de A.; LIMÃOS, E.A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Atividade analgésica do extrato aquoso de *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba). In: Programa e Resumos da XVI Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental – FESBE. Águas de Lindóia. 2001. p. 423. Resumo.

SELVANAYAGAM, Z.E.; GNANAVENAHAN, S.G.; CHANDRASEKHARAN, P. Plants with antsnake venom activity: a review on pharmacological and clinical studies. **Fitoterapia**, v. 65, n. 2, p. 99-111. 1994.

SILVA, J.O.; COPPEDE, J.S.; FERNANDES, V.C.; SANT'ANA, C.D.; TICLI, F.K.; MAZZI, M.V.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **J. Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 145-152, 2005.

SIQUEIRA, D.S., PEREIRA, A. S., AQUINO NETO, F. R., CABRAL, J. C., FERREIRA, C. A. C., SIMONEIT, B. R. T., ELIAS, V. O. Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da Amazônia. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 633-640. 2003.

SOUZA, A. R. B. **Estudo clínico-epidemiológico de pacientes de acidente ofídico produzido pela serpente *Bothrops atrox* na região de Manaus, atendidos na FMTAM**. 2001. 94 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Universidade do Amazonas, Manaus.

TAYLOR, D.A.H. The chemistry of the limonoids from Meliaceae. **Fort.. Chem. Org. Naturst.**, 45, 1-102, 1984.

TEIXEIRA, C.F.P.; LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947-962. 2003.

TEIXEIRA, C. F. P.; CHAVES, F.; ZAMÚNER, S.R.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; FERNANDES, I.; GUTIÉRREZ, J.M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **Int. J. Exp. Path.**, v. 86, p.107-115. 2005a.

TEIXEIRA, C. F. P.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; ZAMUNER, S.F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p.\_\_\_\_\_. 2005b.

VISHWANATH, B.S.; EICHENBERGER, W.; FREY, F.J.; FREY, B.M. Interaction of plant lipids with 14 kDa phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Biochemical Journal**, v. 320, p. 93-99. 1996.

WÜSTER, W. **Venomous snake systematics alert**. Disponível em: <http://www.sbsweb.bangor.ac.uk/~bss166/update.htm> Acesso em: 20 mar. 2003.

ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, p. 335-346. 2005

## APÊNDICES

### APÊNDICE –A

#### 1) PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS

A fim de preservar os tecidos de autólise e conservar suas características para a análise histológica, foi realizado o processamento tecidual das amostras, de acordo com as técnicas descritas por Prophet (1994a), Prophet (1994b), Mills (1994), Hall (1994) e Achstetter (1994), que consistiu das seguintes etapas:

##### **ETAPA 1 - Fixação em formalina tamponada a 10%**

Os coxins das patas posteriores foram colocados em solução fixadora padrão, constituída por formalina tamponada a 10% (PROPHET, 1994a). Cada espécime permaneceu nessa solução por um período mínimo de 6 horas e tempo máximo indeterminado. Em seguida, passaram pelo processamento tecidual.

##### **ETAPA 2 – Descalcificação com ácido fórmico a 10%**

Após a fixação das patas foi feita uma descalcificação com ácido fórmico a 10% (MICHALANY, 1998). Durante dois dias as amostras teciduais foram mantidas imersas em solução de ácido fórmico a 10%, sendo feitas por dia quatro trocas desta solução. Entre cada troca da solução de ácido fórmico foram feitas lavagens com água abundante, a fim de retirar o excesso de cálcio que se depositava no fundo dos tubos onde as amostras teciduais (patas) estavam imersas.

### **ETAPA 3 - Processamento tecidual das amostras**

O processamento tecidual abrangeu a realização de três etapas (PROPHET, 1994b), com duração de 12 a 16 horas. As etapas a) e b) foram realizadas no aparelho histotécnico.

a) Desidratação em soluções alcoólicas com aumento progressivo na concentração das mesmas (70%, 80%, 100% e 100%);

b) Clareamento com xilol;

c) Infiltração pela parafina (PROPHET, 1994b): o emblocamento em parafina foi feito de acordo com MILLS (1994) e HALL (1994). Os fragmentos foram colocados lado a lado ou individualmente em espaços de aproximadamente 1cm x 1cm, delimitados por moldes metálicos ou plásticos. Verteu-se a parafina aquecida até recobrir todo o fragmento. Os moldes foram transferidos para uma placa resfriada até completa solidificação da parafina (cerca de 30 minutos). Os blocos de parafina foram então retirados dos moldes e levados para a microtomia.

### **ETAPA 4 - Microtomia**

A microtomia foi realizada de acordo com ACHSTETTER (1994). Os blocos de parafina foram ajustados ao micrótomo rotativo (marca AOTEC modelo 820) e foram realizados cortes de 3-4  $\mu\text{m}$ . Os cortes foram mantidos em banho-maria (58°C) até o momento da montagem em lâmina de vidro (“pescaria”). As lâminas foram mantidas em estufa (37 – 40°C) por uma noite.

## **ETAPA 5 – Coloração histológica (Hematoxilina-Eosina)**

A coloração utilizada foi a da Hematoxilina-Eosina (ALLEN, 1994), coloração padrão para análise dos aspectos morfológicos gerais. As lâminas com os cortes histológicos foram posicionadas em um suporte metálico e submetidas a imersões na seguinte seqüência:

**1) Xilol:** as lâminas foram imersas duas vezes nessa solução, durante 1 minuto cada, a fim de desparafinizar os cortes histológicos;

**2) Álcool:** em seguida, as lâminas foram imersas em concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 80% e 70%) e água destilada, durante 1 minuto cada, a fim de promover a hidratação dos cortes histológicos;

**3) Hematoxilina:** os cortes foram recobertos pela solução de hematoxilina de Harris por 15 minutos, sendo em seguida lavados em água corrente;

**4) Eosina:** em seguida, foi adicionada a solução de eosina durante 1 minuto, com realização de nova lavagem em água corrente;

**5) Álcool:** os cortes foram submetidos à desidratação em quatro soluções com concentrações crescentes de álcool (80%, absoluto, absoluto e absoluto);

**6) Xilol:** as lâminas foram imersas duas vezes nessa solução, durante 1 minuto cada, para promover o clareamento dos cortes histológicos;

## **ETAPA 6 – Montagem das lâminas**

Após secagem (de mínimo 24 horas) foi feita a montagem lâmina-lamínula utilizando Entellan®.

## 2) PREPARO DE SOLUÇÕES PARA A HISTOPATOLOGIA

### 1) Formalina tamponada a 10%

Solução de Formaldeído 37 – 40%	100 mL
Fosfato de Sódio monobásico	4,0 g
Fosfato de Sódio dibásico, anidro	6,5 g
Água Destilada q.s.p.	1000 MI

Os fosfatos de sódio monobásico e dibásico foram dissolvidos em uma parte de água destilada. Em seguida, foram transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL e foi acrescentada a solução de formaldeído (37-40%), completando o volume com a água destilada e homogeneizando bem. A solução foi armazenada em frasco âmbar com identificação.

### 2) Ácido fórmico a 10%

#### Solução Estoque A:

Citrato de sódio	50 g
Água Destilada q.s.p.	250 mL

#### Solução Estoque B:

Ácido Fórmico 90%	125 mL
Água Destilada q.s.p.	125 mL

As soluções estoque A e B foram preparadas dissolvendo o citrato de sódio e o ácido fórmico, respectivamente. Foi preparada uma solução de uso, dissolvendo parte iguais das soluções estoque A e B. Após homogeneização, foi armazenada em frasco âmbar e identificada.

## 2) Solução Corante de Hematoxilina-Eosina

## a) Hematoxilina de Carazzi

Alúmen de Potássio	25 g
Água destilada	400 mL
Hematoxilina	0,5 g
Iodato de Potássio	0,1 g
Glicerina Pura	100 mL

O alúmen de potássio foi dissolvido em 350 mL de água destilada em aquecimento. A hematoxilina foi misturada vigorosamente com o álcool até completa dissolução, a temperatura ambiente; em seguida a hematoxilina foi adicionada à solução de alúmen ainda quente e levada novamente ao aquecimento até rápida fervura (1 minuto ou menos). Em outro frasco foi dissolvido o óxido de mercúrio em 50 mL de água destilada e depois foi acrescentado lentamente a solução de alúmen (a fim de evitar que fervura). Foi levada ao aquecimento até tornar-se púrpura-escuro e retirada do calor. Foi deixada resfriando a temperatura ambiente. Após completo resfriamento, a solução foi filtrada e armazenada em frasco âmbar, identificando-a.

## b) Eosina:

Eosina	2 g
Dicromato de Potássio	1 g
Solução Aquosa Saturada de Ácido Pícrico	20 mL
Álcool Absoluto	20 mL
Água destilada	160 mL

A eosina foi dissolvida no álcool e o dicromato de potássio em água destilada. As duas soluções foram então misturadas e, em seguida, a solução de ácido pícrico foi adicionada, homogeneizando-a bem. Foi armazenada em frasco âmbar e identificada.

## **APÊNDICE –B**

### **MÉTODO TRADICIONAL DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE ANDIROBA**

Em estudo realizado sobre as potencialidades e produção do óleo de andiroba no Estado do Amazonas, Mendonça (2004) avaliou os métodos de extração do óleo de andiroba e verificou que a extração tradicional pode ser dividida em três etapas: coleta e seleção das sementes; preparo da massa do “pão” e a extração do óleo (Figura 36).

Durante a coleta, são selecionadas as melhores sementes e descartadas aquelas furadas, ruídas, leves, germinadas ou muito escuras; em seguida são armazenadas em sacos de estopa por um período de 3 a 15 dias sob o assoalho das casas. A massa do “pão” é preparada pelo cozimento das amêndoas das sementes, geralmente em latas de alumínio de 18 litros ou panelas de alumínio, em fogo a lenha durante 1 a 3 horas, tempo necessário para atingir o ponto ideal do cozimento (quando ao quebrar uma semente e apertar a amêndoa perceber que ela já está mole). As sementes são colocadas para esfriar em ambiente arejado e armazenadas novamente em local seco (período de repouso), na maioria dos casos, no assoalho das casas sobre ou dentro de sacos de estopa por um período de sete a 20 dias no máximo (ponto ideal para fazer o “pão”). Após o período de repouso, a casca das sementes de andiroba é quebrada com um pedaço de pau ou faca e separada da amêndoa com auxílio do cabo de uma colher. As amêndoas são amassadas com as mãos formando o “pão” de forma globosa. Por fim, é feita a extração do óleo que pode ser feita ao sol, à sombra ou por meio de um tipiti. O óleo obtido é recolhido e filtrado por um pano fino ou algodão e acondicionado geralmente em garrafas de vidro ou de plástico (MENDONÇA, 2004). O armazenamento geralmente é por tempo indeterminado (LUCAS, 1993; HAMMER e JOHNS, 1993).

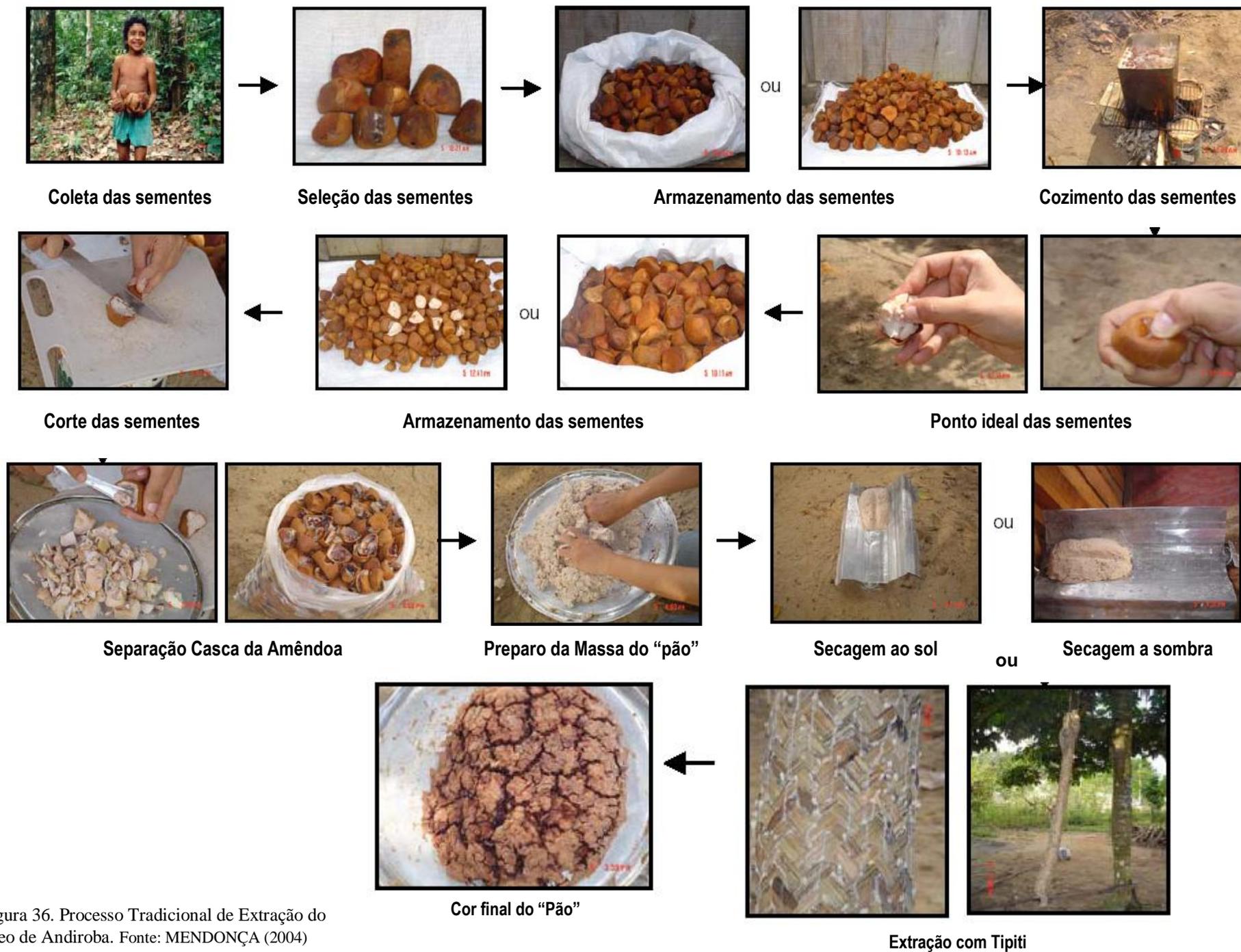


Figura 36. Processo Tradicional de Extração do Óleo de Andiroba. Fonte: MENDONÇA (2004)

## ANEXO

### ANEXO – A FORMULÁRIO DE EFEITOS FARMACOLÓGICOS GERAIS

GRUPO: \_\_\_\_\_

DATA: \_\_\_\_\_

Dose:	Tempo após a injeção do extrato bruto							
Cam Nº:	5 min	30 min	60 min	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
<b>Indicadores</b>								
Movimentação								
Frequência respiratória								
Piloereção								
Alteração do tônus muscular								
Convulsões								
Contorções abdominais								
Tremores								
Sialorréia								
Diarréia								
Sedação / Hipnose								
Ptose palpebral								
Passividade								
Alienação ambiente								
Numero de animais mortos								
Agressividade								
Palidez								
Cianose								
Hiperemia								
Outros:								