

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**EFEITOS DO AR-TURMERONE, ISOCURCUMENOL E SORO
ANTIBOTRÓPICO EM COELHOS APÓS INOCULAÇÃO
DO VENENO DE *Bothrops jararaca***

Paulo Gabriel Pereira da Silva Junior

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal

Curso: Ciência Animal

Área: Patologia e Ciências Clínicas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marília Martins Melo

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2007

Paulo Gabriel Pereira da Silva Junior

**EFEITOS DO AR-TURMERONE, ISOCURCUMENOL E SORO
ANTIBOTRÓPICO EM COELHOS APÓS INOCULAÇÃO
DO VENENO DE *Bothrops jararaca***

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal

Curso: Ciência Animal

Área: Patologia e Ciências Clínicas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marília Martins Melo

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2007

S586e Silva Junior, Paulo Gabriel Pereira da, 1972-
Efeitos do ar-turmerone, isocurcumenol e soro antibotrópico em coelhos após
inoculação do veneno de Bothrops jararaca / Paulo Gabriel Pereira da Silva Júnior. – 2007.
81 p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo

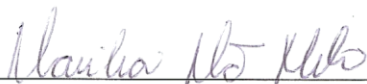
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Coelho – Doenças – Tratamento – Teses. 2. Envenenamento – Teses. 3. Veneno de
Cobra – Teses. 4. Toxicologia experimental – Teses. I. Melo, Marília Martins.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

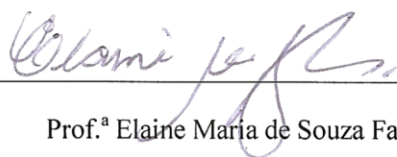
CDD – 636.932 208 96

Tese defendida e aprovada em 13 de junho de 2007, sendo a banca examinadora:

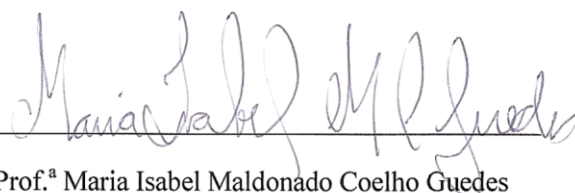


Prof.^a Marília Martins Melo

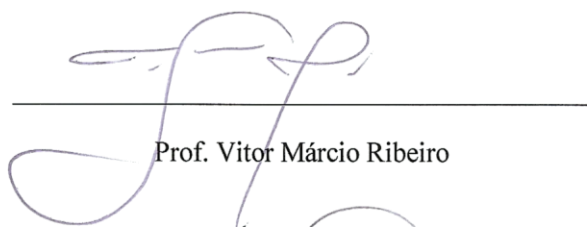
(orientadora)



Prof.^a Elaine Maria de Souza Fagundes



Prof.^a Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes



Prof. Vitor Márcio Ribeiro



Prof. Carlos Delfin Chávez Olórtgui

A Hannah, minha Amiga (*in memoriam*).

Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo Gabriel e Angela Christina, pelo apoio incondicional e estímulo. Muito obrigado por tudo!

À Elaine, meu Amor, por estar ao meu lado todo o tempo. Ajudou-me a construir este sonho, sonhamos juntos e viveremos uma nova realidade! Amo-te muito Mais!

À minha orientadora, Marília Martins Melo. Muito Obrigado pelo convívio, ensinamentos e estímulo incondicional.

À minha Avó Hedyr, mãe duas vezes. Se não fosse você...

À minha Avó Ida, lá de cima cuidando de todos nós!

Aos meus padrinhos Helena e Santo Logato. Sei que sempre olham por mim!

À D. Ana Maria, sogra que pedi a Deus, pelas orações e pensamentos positivos.

A Hannah (tudo começou com você...), Heidi, Hulla, Mel, Vida, Íris, Luna, e Sol!

Ao Warley “Sabará” Efreim Campos, Irmão que Deus me deu, Exemplo a ser seguido! Meu Ídolo!

Ao meu mais que amigo Durval Verçosa Junior, companheiro de todas as coletas, análises, lamentações e co-autor deste projeto. Não tenho como agradecer sua amizade e sua ajuda incondicional! Meu Guru! É difícil!

Ao meu Amigo Rodrigo Rabelo! Ícone de uma geração! Mesmo distante sempre me deu o maior apoio! Valeu garoto!

À Ana Paula Madureira pela amizade de muitos anos!

Ao amigo Geraldo César Juliani Santos. Dividimos nossas preocupações e vitórias! Saudações Tricolores!

Ao amigo Roberto Mauro “Tigrão” Gil de Lima pelos momentos de descontração cheios de sabedoria única! Muito obrigado pelo apoio!

Às colegas Fabiene Ferreira e Fabiana Lessa Silva pela amizade.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite, por me possibilitar usar o Laboratório.

Ao Professor Gerhard G. Habermehl, por fornecer os tratamentos e a literatura de apoio.

À Professora Maria Lúcia, por ceder o veneno utilizado neste experimento.

Ao Professor Carlos Delfin Chavez Olórtégui pelos ensinamentos e realização dos exames de ELISA.

À Professora Ana Maria Dantas Barros, que nos ajudou a isolar o ar-turmerone.

Ao Professor Rubens Antônio Carneiro pelo apoio e vasto conhecimento de Patologia Clínica.

Ao Professor Ernane Fagundes do Nascimento por permitir o nosso trabalho no laboratório de histopatologia.

À Amiga e Professora Roselene Ecco. Todos os agradecimentos serão insuficientes para retratar o quanto lhe sou grato! Muito Obrigado!

À Professora Ângela Lana e Danilo Bastos pelo auxílio na realização da estatística.

À Mariana Cunha Longuinhos Pinto, minha filha adotiva, que passou comigo muitos dias dentro dos laboratórios, cercada de tubos e sempre com um sorriso lindo no rosto.

Ao Eduardo Lara Ribeiro, maluco de plantão! Só um maluco para fazer tantos ELISAs!

À Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães pelo auxílio nas coletas.

À Taismara Simas de Oliveira, por realizar as necropsias.

À Márcia Elisa Resende, pelas dicas e pelas análises de CK.

À Gissandra Farias Braz pelo apoio na realização dos exames de uréia e creatinina.

À Lisa Felicori, por nos orientar na realização dos ELISAs.

À Marilene que me ensinou a preparar as lâminas e pelas tardes de boa conversa.

Ao amigos Fábio e Édem, pelos momentos de relaxamento e discussão sobre o esporte bretão.

Ao Laboratório TECSA pela condição especial e tratamento dispensado.

A Socil, por ceder parte da alimentação dos animais.

Aos componentes do Colegiado de Pós Graduação pelo carinho e pelo atendimento!

Ao Vágner, Claiton e Hélio (Xerox), que sempre me proporcionaram um atendimento especial.

Ao Sr. Rogério Baracat de Araújo e funcionários da cantina pelo carinho e pelo atendimento

SUMÁRIO

	RESUMO	15
	ABSTRACT	16
1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	18
2.1.	Geral	18
2.2.	Específico	18
3.	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1.	<i>Bothrops jararaca</i>	19
3.2.	O veneno botrópico	19
3.2.1.	Ação local do veneno botrópico	20
3.2.2.	Ação sistêmica do veneno botrópico	22
3.3.	Tratamento do envenenamento botrópico	24
3.3.1.	Soro antibotrópico	24
3.3.2.	Fitoterápicos	25
3.3.2.1.	<i>Curcuma longa</i>	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1.	Animais	29
4.2.	Inoculação do veneno	29
4.3.	Grupos experimentais	30
4.4.	Avaliação das lesões locais	32
4.5.	Coleta de material	33
4.6.	Exames complementares	33
4.7.	Exames anatomopatológicos	34
4.8.	Análise estatística	34
5.	RESULTADOS	34
5.1.	Avaliação das lesões locais	34
5.2.	Avaliação da hemostasia	41
5.3.	Avaliação da bioquímica sérica	44
5.4.	Hematologia	48
5.5.	Achados de necropsia	55
5.6.	Histopatologia	56
6.	DISCUSSÃO	58
6.1.	Lesões locais	58
6.2.	Hemostasia	60
6.3.	Bioquímica sérica	63
6.4.	Hematologia	64
6.5.	Achados de necropsia	66
6.6.	Histopatologia	66
7.	CONCLUSÕES	67
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9.	APÊNDICES	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema de tratamento	31
Tabela 2 – Valores médios das dobras cutâneas (cm) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	36
Tabela 3 – Valores médios dos halos hemorrágicos (cm) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	39
Tabela 4 – Valores médios das ulcerações dérmicas (cm) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	40
Tabela 5 – Valores médios do tempo de coagulação (segundos) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	41
Tabela 6 – Valores médios do tempo de protrombina (segundos) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	42
Tabela 7 – Valores médios do tempo de tromboplastina parcial ativada (segundos) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	43
Tabela 8 – Valores médios de contagem de plaquetas (mm ³) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	44
Tabela 9 - Valores médios de uréia (mg/dl) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	45
Tabela 10 - Valores médios de creatinina (mg/dl) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	45

Tabela 11 - Valores médios de alanina aminotransferase (U/ml) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	46
Tabela 12 - Valores médios de aspartato aminotransferase (U/ml) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	47
Tabela 13 - Valores médios de creatina fosfotransferase (U.I./l) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	48
Tabela 14 - Valores médios da contagem de hemácias ($10^6/\text{mm}^3$) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	48
Tabela 15 - Valores médios de hematócrito (%) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	49
Tabela 16 - Valores médios de hemoglobina (g/dl) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	50
Tabela 17 - Valores médios de volume globular médio (μ^3) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	50
Tabela 18 - Valores médios de hemoglobina globular média (pg) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	51
Tabela 19 - Valores médios da concentração de hemoglobina globular média (pg) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	52

Tabela 20 - Valores médios do número total de leucócitos (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	52
Tabela 21 - Valores médios do número absoluto de neutrófilos (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	53
Tabela 22 - Valores médios do número absoluto de bastonetes (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	54
Tabela 23 - Valores médios do número absoluto de linfócitos (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	54
Tabela 24 - Valores médios do número absoluto de basófilos (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	55
Tabela 25 - Valores médios do número absoluto de monócitos (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Serpente <i>Bothrops jararaca</i> (Wied, 1824).	19
Figura 2 – Estrutura molecular do ar-turmerone	28
Figura 3 – Estrutura molecular do isocurcumenol	29
Figura 4 – Inoculação intradérmica do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	30
Figura 5 – Quadro dos momentos de realização dos exames clínicos	32
Figura 6 – Leitura da espessura da dobra cutânea, régua de gabaritos circulares para a medida de halo hemorrágico e ulceração dérmica	33
Figura 7 – Quadro dos momentos de realização das coletas hematológicas	33
Figura 8 – Lesão local após inoculação subcutânea do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> em coelhos aos 10 minutos e as 10, 24, 48, 96 e 168 horas	38
Figura 9 – Necropsia do animal 6 (Grupo I)	56
Figura 10 – Fotomicrografia do fígado de um coelho do Grupo I, demonstrando degeneração por glicogênio intensas e difusas (Hematoxilina e Eosina, 100x, 200x e 400x).	57
Figura 11 – Fotomicrografia da pele de um coelho do Grupo I, demonstrando epidermite e dermatite necrótica granulocítica aguda e extensa e ulceração dérmica fibrinóide da parede vascular (Hematoxilina e Eosina, 100x, 200x e 400x).	57

Apêndices

Apêndice 1 – Tabela de valores de referência	81
Apêndice 2 – Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
CK	Creatina-fosfotransferase
dl	Decilitro
DL	Dose letal
g	Gramma
G	Grupo
Ig	Imunoglobulina
kg	Quilograma
Mg	Miligramma
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
NK	<i>Natural killer</i>
T	Tempo
TNF	Fator de necrose tumoral
VGM	Volume globular médio
µg	Microgramma

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo verificar a eficácia dos tratamentos com soro antibotrópico, ar-turmerone e isocurcumenol por meio das alterações clínicas, hematológicas e hemostáticas em coelhos após envenenamento experimental por *Bothrops jararaca*. Quarenta e oito coelhos da raça Nova Zelândia, inoculados com 0,4mg/kg do veneno via intradérmica na face lateral do membro posterior direito, foram divididos aleatoriamente em seis grupos de oito animais: grupo I – vaselina tópica no local da inoculação do veneno, duas vezes ao dia por 15 dias; grupo II – ar-turmerone (1%) tópico no local da inoculação do veneno, duas vezes ao dia durante 15 dias; grupo III – isocurcumenol (0,1%) tópico no local da inoculação do veneno, duas vezes ao dia durante 15 dias; grupo IV – ar-turmerone (1%) tópico no local da inoculação do veneno, duas vezes ao dia durante 15 dias e soro antibotrópico diluído em Solução Fisiológica 0,9% IM, dose única suficiente para neutralizar 0,4mg/kg de veneno; GV – isocurcumenol (0,1%) tópico no local da inoculação do veneno, duas vezes ao dia durante 15 dias e soro antibotrópico diluído em Solução Fisiológica 0,9% IM, dose única suficiente para neutralizar 0,4mg/kg de veneno; Grupo VI - soro antibotrópico diluído em Solução Fisiológica 0,9% IM, dose única suficiente para neutralizar 0,4mg/kg de veneno. Os tratamentos tópicos e subcutâneos foram realizados 30 e 60 minutos após a inoculação o veneno respectivamente. O ar-turmerone e isocurcumenol tópicos não evitaram a formação de edema e halos hemorrágicos, assim como a instalação de alterações locais. Os menores índices de lesão dérmica foram observados nos animais tratados com ar-turmerone, enquanto o soro antibotrópico e suas associações não impediram a ocorrência de ulcerações dérmicas. O ar-turmerone apresentou ação superior sobre os tempos de coagulação e protrombina, enquanto o tempo de tromboplastina parcial ativada permaneceu acima dos valores de referência em todos os grupos. Os exames bioquímicos revelaram a concentrações de AST e ALT maiores nos animais de GII e GIII, assim como os valores de CK. Não foram evidenciadas alterações histopatológicas comprovadamente relacionadas ao envenenamento botrópico nos rins, pulmão, coração e baço. O exame histopatológico da pele demonstrou dermatite necrótica granulocítica aguda e extensa, além da degeneração fibrinóide da parede vascular. Os testes de ELISA foram capazes de detectar veneno de *Bothrops jararaca*, IgG produzida pelos coelhos, assim como a IgG equina proveniente do soro antibotrópico, além da maior permanência do veneno botrópico nos animais tratados com o soro específico. Conclui-se que o ar-turmerone e o isocurcumenol podem ser utilizados como tratamento complementar tópico na tentativa de minimizar as lesões locais e alterações da hemostasia.

Palavras-chave – Soro antibotrópico, ar-turmerone, isocurcumenol, *Bothrops*, coelho.

ABSTRACT

The present paper has the primary objective of verifying the efficacy of antithrombotic serum, ar-turmerone and isocurcumenol treatments on haematological, hemostatic and locally induced alterations under experimental *Bothrops jararaca* poisoning in rabbits. Forty eight new Zealand rabbits were inoculated with 0,4 mg/kg of the venom IM, in the lateral side of the right leg, and divided in six groups, with eight animals in each one, as follows: group I – Topic vaseline right upon the inoculation site, twice a day, for 15 days; group II – Topic ar-turmerone (1%) right upon the inoculation site, twice a day, for 15 days; group III – Topic iso-curcuminol (0,1%) right upon the inoculation site, twice a day, for 15 days; group IV - Topic ar-turmerone (1%) right upon the inoculation site, twice a day, for 15 days and antithrombotic serum (IM) diluted in 0,9% saline, once, in a dose range enough to neutralize 0,4 mg/kg of venom; group V - Topic iso-curcuminol (0,1%) right upon the inoculation site, twice a day, for 15 days and antithrombotic serum (IM) diluted in 0,9% saline, once, in a dose range enough to neutralize 0,4 mg/kg of venom; group VI - antithrombotic serum (IM) diluted in 0,9% saline, once, in a dose range enough to neutralize 0,4 mg/kg of venom. Ar-turmerone and isocurcumenol were ineffective against oedema, hemorrhagic spots. Ar-turmerone showed better response on coagulation factors. AST and ALT levels were higher in groups II and III. Skin histopathologic exam revealed extensive acute granulocytic necrotic dermatitis. ELISA test detected *B. jararaca* venom, rabbit IgG and horse IgG from antithrombotic serum. This way, ar-turmerone and isocurcumenol could be used as complementary topic treatments on bothropic envenoming.

Key-words - antithrombotic serum, ar-turmerone, isocurcumenol, *Bothrops*, rabbit.

1. INTRODUÇÃO

Na medicina humana, o acidente causado pelas serpentes do gênero *Bothrops* destaca-se por ser o de maior incidência (cerca de 90%) entre os casos de ofidismo (Fontequ et al., 2001; Franco et al., 2001). Porém na medicina veterinária, estes dados são estimados, pois nunca existiu a notificação obrigatória, além do que os acidentes ofídicos são de difícil diagnóstico por acontecerem na área rural (Mirtschin et al., 1998).

Pesquisas realizadas em algumas regiões indicam semelhanças entre o número de pessoas e animais envenenados. Estudo realizado por Bochner e Struchiner (2004) demonstrou que no estado do Rio de Janeiro, apenas em 50% dos acidentes envolvendo homens e animais, houve declaração do gênero ou espécie envolvida. Das serpentes identificadas, mais de 98% pertenciam ao gênero *Bothrops*, e destas 66% eram da espécie *B. jararaca*.

A maior parte dos casos de acidentes ofídicos ocorre nos meses de janeiro, fevereiro e março, período em que as serpentes apresentam maior atividade em busca de alimento e para reprodução. Segundo Acosta de Pérez & Brem (1997), na Argentina, 99,5% dos acidentes ofídicos nos animais domésticos são causados por serpentes do gênero *Bothrops*, e a espécie canina é a mais acometida (76%), seguida pelos bovinos (14%) e eqüinos (10%). No Brasil, as espécies domésticas mais sensíveis ao veneno botrópico são os eqüinos e bovinos (Melo et al., 2004).

As serpentes do gênero *Bothrops*, grupo constituído por mais de 30 espécies, pertencem ao reino *Animalia*, filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, classe *Reptilia*, ordem *Ophidia*, superfamília *Viperoidea*, família *Viperidae* e subfamília *Crotalinae*. Morfologicamente possuem cabeça triangular apresentando pequenas escamas,

diferentes daquelas que recobrem todo o corpo que são quilhadas, além de pupilas verticais, indicando uma melhor adaptação à visão noturna. Uma característica particular dos tanatofídeos brasileiros, com exceção das corais, é a presença de fosseta loreal. Esta estrutura está localizada entre os olhos e as narinas das serpentes e possui função de termorrecepção, facilitando a adaptação do ofídio a ambientes escuros, importante para auxiliar na caça de pequenos roedores. Outra importante característica dos tanatofídeos é o complexo aparelho inoculador de veneno, constituído por dentes localizados na região anterior da cavidade bucal. Estes dentes se projetam no momento do bote e quando o animal está com a boca fechada, eles se postam perpendicularmente ao palato, com movimento de dobradiça (Alves et al., 1989; Borges, 1999; Oliveira, 1999).

Os venenos das diferentes espécies de ofídios são constituídos por uma complexa mistura de enzimas, proteínas e peptídeos. Algumas destas substâncias são comuns em venenos de diferentes espécies. Todavia, as enzimas proteolíticas estão presentes em concentrações mais elevadas no veneno botrópico (Hudelson & Hudelson, 1995a). Nestes acidentes, as alterações clínicas mais importantes se caracterizam por edema e dor local e se devem as ações proteolíticas do veneno (Gutierrez e Lomonte, 1989, Cardoso, 1990). O edema ocorre pela atuação destas enzimas sobre substratos diversos, causando lesão tecidual (ação direta) e provocando a liberação de substâncias dos tecidos lesados, como mediadores do processo inflamatório, que ampliam a lesão (ação indireta).

A ação proteolítica do veneno botrópico é responsável pela destruição tecidual e conseqüente quadro severo de ulceração dérmica local (Gutierrez e Lomonte, 1989, Silva Junior, 2003). A ulceração dérmica constitui o sinal local de maior importância, podendo atingir apenas o subcutâneo ou comprometer estruturas mais profundas,

como músculos, tendões e ossos (França e Fan, 1992). Pode ocorrer devido à ação direta de miotoxinas que afetam a integridade da membrana plasmática das células do músculo esquelético e/ou indiretamente pela ação do veneno sobre a rede vascular que leva a isquemia (Gutierrez e Lomonte, 1989). No envenenamento botrópico humano, a ulceração dérmica é uma complicação temível, ocorrendo no local da picada em cerca de 10% dos acidentados (França e Fan, 1992). No envenenamento botrópico veterinário, a lesão local com presença de necrose cutânea também ocorre em várias espécies animais (coelhos, cães, bovinos e eqüinos) resultando óbitos ou sacrifícios desses, com grandes prejuízos (Melo et al., 2004).

O tratamento clássico instituído para evitar os sinais do envenenamento botrópico é baseado no uso de soro específico, eficaz na reversão do quadro sistêmico. Porém, a ação do soro não antagoniza os sinais locais (Gutiérrez & Lomonte, 1989; Melo et al., 2004). Em virtude da gravidade dos sinais locais provocados pelo acidente botrópico, é imperativa a busca de novos tratamentos, auxiliares à administração do soro antiofídico, que proporcionem a minimização destes efeitos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo deste trabalho foi comparar e verificar a eficiência do ar-turmerone e do isocurcumenol, substâncias isoladas da *Curcuma longa*, como tratamentos locais, auxiliares ao soro antibotrópico, por meio dos parâmetros clínicos e laboratoriais.

2.2. Específicos

Avaliar os efeitos locais do veneno de *Bothrops jararaca* em coelhos tratados com ar-turmerone, isocurcumenol, soro antibotrópico e suas associações através de:

- grau de edema;
- halo hemorrágico;
- ulceração dérmica;
- histopatológico de pele e musculatura.

Avaliar parâmetros sistêmicos do envenenamento botrópico por meio de:

- contagem total e diferencial de leucócitos, de eritrócitos, plaquetas, concentração de hemoglobina, volume globular, índices hematimétricos;
- tempo de coagulação, tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada;
- uréia, creatinina, creatina-fosfotransferase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT);
- avaliações anatomopatológicas de coração, pulmão, fígado, baço, rins e pele.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Bothrops jararaca*

Popularmente conhecida como Jararaca ou Jararaca preguiçosa, apresenta coloração muito variável (dos tons acastanhados ao preto), de agilidade notável e grande capacidade adaptativa, determinando a sua grande distribuição. Alguns autores citam

que pode ser encontrada em todo o território brasileiro (Barravieira e Marques, 1990; Borges e Araújo, 1998). Melgarejo (2003) afirma que esta é a espécie mais comum na região sudeste e distribui-se do sul da Bahia ao Rio Grande do Sul. Seu comprimento médio é de 1,0 metro e a cada parição nascem de três a 35 filhotes, com aproximadamente 20cm (Janeiro-Cinquini, 2004) (Fig. 1).



Figura 1 – Serpente *Bothrops jararaca* (Fonte: Paulo Gabriel Pereira da Silva Junior)

3.2. O veneno botrópico

O veneno botrópico é extremamente complexo e constitui-se de uma mistura de substâncias, entre elas proteínas e peptídeos de pequeno peso molecular, correspondendo a mais de 90% do extrato seco (Seegers e Ouyang, 1979; Santoro e Sano-Martins, 1993; Méndez, 1998). Entre outros componentes incluem-se o citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos e pequenas quantidades de aminoácidos livres e lipídeos (Bieber, 1979; Freitas et al., 1992). O citrato é o componente mais abundante dos venenos ofídicos e sua função é proporcionar estabilidade à toxina, já que inibe a ação proteolítica das proteases metalo-dependentes (Francis et al., 1992; Freitas et al., 1992; Odell et al., 1998). Apresentam ainda enzimas como proteases, fosfolipase A₂, fosfodiesterases e 5'-nucleotidases, que interferem diretamente o

processo hemostático (Seegers e Ouyang, 1979; Markland, 1998). As enzimas proteolíticas também estão presentes em concentrações elevadas (Rosenfeld et al., 1959; Hudelson e Hudelson, 1995a).

O veneno botrópico pode apresentar variações decorrentes de diferentes localizações geográficas, fases de desenvolvimento e sexo dos animais (Rosenfeld et al, 1959; Kouyoumdjian e Polizelli, 1989; Ferreira et al., 1992; Furtado et al., 2006). Entretanto Rocha e Furtado (2005) demonstraram que nenhuma correlação pôde ser feita entre a localização geográfica e a predominância de uma determinada ação sobre os organismos animais.

A variação na composição do veneno também foi observada entre serpentes de idades diferentes, com predominância da atividade coagulante nos ofídios mais

jovens. Essa ação é decorrente da maior concentração de ativadores de protrombina e fator X (Rosenfeld et al, 1959; Kamiguti e Hanada, 1985, Maruyama et al., 1990).

O grande dimorfismo sexual apresentado pela *B. jararaca* é refletido na constituição do veneno. As fêmeas, até cinco vezes maiores que os machos, possuem comportamento alimentar característico, ingerindo mamíferos maiores, enquanto os machos comem pequenos roedores. Apesar, da maior produção de veneno e capacidade de inoculação desse pelas fêmeas, a atividade edemaciante do veneno é semelhante à dos machos. Em contrapartida o veneno da fêmea é mais hemorrágico e causa menor mioulceração dérmica, diferentemente dos machos, que é menos hemorrágico e mais mionecrótico (Furtado et al, 2006).

Não se conhece ao certo os mecanismos de controle da síntese e secreção do veneno pelas glândulas (Yamanouye et al, 1997). A quantidade de veneno inoculada em cada bote dependerá do tipo de picada (defensiva ou não), do tamanho do animal ofendido e do estresse ao qual esteja submetido. Sabe-se que a serpente não injeta todo o veneno em apenas um bote. A maior quantidade de veneno extraído manualmente de uma *B. jararaca*, fêmea e adulta, foi de 197mg. Este processo é capaz de retirar cerca de 75% do veneno total. Neste mesmo trabalho não se observou diferenças estatísticas entre a quantidade de veneno produzida por adultos e jovens, machos e fêmeas (Puerto et al., 1996).

3.3.1. Ação local do veneno botrópico

A constituição variada dos venenos animais permite grande variedade de efeitos determinados não só pelas ações isoladas de cada um dos seus componentes, mas primordialmente, pela interação e sinergia entre as frações.

Uma das principais características do acidente causado por serpentes do gênero *Bothrops* é dor intensa e imediata. Tal ocorrência é relatada tanto em acidentes envolvendo vítimas humanas (Gutiérrez, 1995), quanto em animais (Silva Junior, 2003).

A dor é consequência de alterações na transdução nos nociceptores, sendo modulada por mediadores inflamatórios. A hiperalgesia causada pelo veneno botrópico é induzida e mediada por prostaglandinas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária, além de aminas biogênicas e metaloproteases (Chacur et al., 2001).

A substância responsável pelo início do processo de hiperalgesia é a bradicinina, que por sua vez estimula a liberação de fator de ulceração dérmica tumoral, interleucinas, eicosanóides e aminas simpatomiméticas, sendo as duas últimas consideradas mediadores finais da hiperalgesia. A inoculação intraplantar do veneno de *Bothrops jararaca* (5µg) em patas de ratos determinou uma redução no limiar de dor, observada com maior intensidade uma hora após a inoculação, decrescendo até desaparecer com 24 horas. O uso de icatibant, inibidor de receptores de bradicinina (B₁ e B₂) reduziu significativamente a hiperalgesia. Tal experimento evidenciou a função da bradicinina como mediadora da dor nos envenenamentos botrópicos (Chacur et al., 2002).

O edema local é um dos mais destacados sinais clínicos apresentados por animais picados por serpentes do gênero *Bothrops*. Esta ocorrência é multifatorial e se deve às ações dos diversos componentes da toxina. O veneno botrópico age sobre a vasculatura, aumentando a permeabilidade dos vasos e por sua vez levando ao extravasamento de fluidos. As fosfolipases determinam a liberação de histamina por mastócitos, assim como causam lesões nos diversos tipos

celulares, com liberação de ácido araquidônico pelos fosfolípidos de membrana. Tais fenômenos potencializam o processo inflamatório de forma a diminuir a eficiência dos tratamentos estabelecidos, assim como o antiveneno, que se mostra pouco eficaz na reversão do quadro inflamatório (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Gutiérrez, 1990; Selistre et al., 1990; Moura-da-Silva et al., 1996; Faria et al., 2001).

Outra consequência freqüente da inoculação de veneno botrópico é a formação de bolhas. A sua ocorrência se deve a alterações em várias camadas da pele, normalmente com separação da junção derme-epiderme. Os queratinócitos não apresentam sinais de citotoxicidade, sendo assim, as bolhas decorrem da influência do veneno sobre a matriz extracelular e componentes de adesão celular (Rucavado et al., 1998).

A necrose resultante das diversas ações do veneno botrópico é a mais dramática das seqüelas desta intoxicação, responsável por perdas definitivas de tecido e conseqüente perda de função e amputações (Rosenfeld, 1971). Sua ocorrência, em um primeiro momento, se deve à ação de miotoxinas, que possuem estrutura semelhante à fosfolipase A₂. Posteriormente outros fatores como o edema e a ação de hemorraginas atuam sinergicamente na potencialização da formação de ulceração dérmica (Gutiérrez et al., 1984).

A análise histológica de fragmentos de músculo de ratos que receberam a inoculação de 20µg de veneno botrópico diluído em 0,1ml de salina resultou em uma extensa mioulceração dérmica, com recuperação ao sétimo dia após a inoculação. Algumas áreas apresentaram a substituição do tecido muscular por tecido de granulação e tecido fibroso. O tecido muscular regenerado apresentava fibras de diâmetro inferior às normais (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Gutiérrez et al., 1986).

A ulceração dérmica se instala mesmo nos envenenamentos menos graves e que recebem tratamento adequado. Ferreira Junior e Barraviera (2001) relataram acidente envolvendo um cão que apresentava sinais clínicos de envenenamento classificado como moderado, que mesmo recebendo soro antiofídico polivalente de uso veterinário (Vencofarma) três horas depois do envenenamento, exibiu dois pontos ulceração dérmica no local envolvido.

A inoculação de miotoxinas em patas de camundongos determinou dificuldades na movimentação destes animais, embora nenhuma hemorragia tenha sido observada. As primeiras alterações morfológicas locais são observadas após 15 minutos e são caracterizadas por degenerações focais com perda da membrana plasmática dos miócitos (Gutiérrez et al., 1984; Gutiérrez e Lomonte, 1989; Gutiérrez et al., 1990; Gutiérrez et al., 1991).

A lesão de células musculares ocasiona o aumento plasmático de creatina kinase (CK), enzima responsável por disponibilizar ATP para a contração muscular através da fosforilação de ADP a partir da creatina fosfato (Cardinet III, 1997). O pico plasmático de CK ocorre entre uma e três horas após a injeção de miotoxinas botrópicas. A avaliação da regeneração do tecido se mostra normal, diferentemente do que acontece quando se inocula o veneno bruto. Esta diferença na recuperação se deve à lesão de vasos, impedindo o processo de cicatrização tecidual (Gutiérrez et al., 1984; Gutiérrez et al., 1989; Gutiérrez et al., 1990; Gutiérrez et al., 1991). A inoculação perimuscular do veneno de *B. jararacussu* em ratos causou a concentração plasmática de CK dose dependente, ou seja, quanto maior a dose de veneno, maior é a lesão muscular e conseqüentemente, maior concentração de CK. O mesmo aumento foi observado utilizando-se a mesma dose de veneno em volumes variados. Quanto maior

o volume de veneno, maior a lesão causada (Calil-Elias et al., 2002).

O envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* causam intensa reação local que ao final leva à ulceração dérmica. Este tecido desvitalizado pode ser infectado secundariamente por microrganismos originários da flora oral do ofídio, ocasionando abscessos. Entre estes microrganismos destacam-se as enterobactérias (*Morganella morganii*, *Proteus rettgeri*, *Enterobacter sp.* e *Escherichia coli*) e estreptococos (*Enterococcus sp.* e *Bacteroides sp.*) (Jorge e Ribeiro, 1997; Quiroga et al., 2000).

3.3.2. Ação sistêmica do veneno botrópico

Entre as principais de causas de óbito decorrentes do envenenamento botrópico se destaca a insuficiência renal aguda. Esta patologia ocorre secundariamente às alterações renais em razão de formação de trombos, vasoespasmos, ou mesmo decorrente da ação direta do veneno lesando os vasos sanguíneos que irrigam os rins. Tais alterações levam à ulceração dérmica tubular aguda, ulceração dérmica cortical e, ocasionalmente, à glomerulonefrite (Amaral et al., 1985, Amaral et al., 1986; Havt et al., 2001). O uso de antiveneno não se mostra eficiente na prevenção do desenvolvimento de lesões renais (Amaral et al., 1985).

As causas das lesões renais permanecem obscuras e alguns experimentos buscam detalhar a fisiopatologia deste envenenamento (Barbosa et al., 2002). Entre os achados histopatológicos nos rins de ratos que receberam veneno de *B. moojeni* intravenoso estão picnose dos núcleos das células dos túbulos proximais, vacuolização dos citoplasmas e em alguns túbulos, degeneração e descamação de células necróticas (Boer-Lima, et al., 1999; Boer-Lima, et al., 2002).

Devido às metaloproteinases, cavalos podem apresentar laminite aguda caracterizada por separação da membrana lamelar do casco das células basais da epiderme. Esta patologia não se restringiu ao membro acometido e se estendeu ao membro contralateral, enfatizando o caráter sistêmico deste envenenamento (Acosta de Pérez et al., 2006).

O envenenamento botrópico é responsável por alterações hematológicas e hemostáticas graves. Nas diversas espécies estudadas, observou-se uma diminuição do número de hemácias, do hematócrito e dos níveis de hemoglobina (Sano-Martins, 1990; Sano-Martins et al., 1995; Soerensen et al., 1995; Takahira, 1996; Silva Junior, 2003). Tais achados se justificam pelo extravasamento de sangue por ação das hemorraginas, que são potentes metaloproteinases que degradam proteínas da matriz dos vasos e em consequência, rompem os capilares (Franceschi, 1990; Melo et al., 2004; Gutiérrez et al., 2005). A ação das metaloproteinases sobre a membrana dos vasos capilares foi demonstrada pelas toxinas hemorrágicas de *B. atrox*, que degradam os componentes da matriz extracelular dos vasos capilares como o colágeno e a laminina (Maldelbaum, 1990). A ação hemorrágica do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* causa hemorragias locais e sistêmicas. Os sinais sistêmicos observados são a gengivorragia, hematúria, equimoses em locais distantes à picada, e sangramentos em feridas recentes, sendo descritos também hemoptise, epistaxe, sangramento conjuntival e hematemesa (França e Fan, 1992; Jácome, 2002; Santos, 2002; Silva Junior, 2003).

A inoculação de 100µg de veneno de *B. jararaca*, por via intravenosa em cães, causou leucocitose, neutrofilia, linfopenia e monocitose (Sano-Martins et al., 1995; Arruda et al., 2003). As mesmas alterações foram verificadas por Takahira (1996). Estas alterações se atribuem ao intenso processo

inflamatório local, além da liberação de mediadores inflamatórios. A ação de enzimas do veneno botrópico em fosfolípídeos de membranas celulares pode levar à liberação de ácido araquidônico, que uma vez liberado, é convertido em prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, através da via catalisada pela ciclooxigenase; ou em ácido hidroxieicosatetraenóico e leucotrienos, derivados da via catalisada pela lipoxigenase (França e Fan, 1992; Farsky et al., 1997).

Muitas interações entre frações do veneno botrópico e o sistema hemostático foram descritas: 1) coagulação do fibrinogênio; 2) degradação do fibrinogênio; 3) ativação do plasminogênio; 4) ativação da protrombina (fator II); 5) ativação do fator V; 6) ativação do fator X; 7) atividades anticoagulantes, incluindo, inibição da formação do complexo da protrombinase, inibição da trombina e fosfolipases; 8) atividade hemorrágica; 9) degradação dos inibidores das proteases séricas; 10) indução da agregação plaquetária e 11) inibição da agregação plaquetária, incluindo as α -fibrinogenases, fosfolipases e desintegrinas (Markland, 1998).

O sistema hemostático é muito influenciado pelo veneno botrópico. A ação anticoagulante deve-se ao consumo de fibrinogênio pela atividade de frações similares à trombina, frações ativadoras da protrombina e frações ativadoras do fator X, que levam à formação de trombos intravasculares. Com a formação de trombos intravasculares ocorre o consumo de fibrinogênio por ativação do sistema fibrinolítico. Além disso, as proteases produzem fibrinólise e fibrinogenólise (Rosenfeld et al., 1959; Kaiser e Michl, 1971; Sano-Martins, 1990; Kamiguti et al., 1991; França e Fan, 1992; Sano-Martins et al., 1995; Roodt et al., 1996; Laing e Mourada-Silva, 2005). Os transtornos da coagulação iniciam-se aos 30 minutos posteriores a inoculação do veneno nos cães

(Koscinczuk et al., 1995). Santos et al. (2003a) relataram aumento dos tempos de coagulação, protrombina e tromboplastina parcial ativada em cães após inoculação de veneno de *Bothrops alternatus*. Com o consumo de fibrinogênio, podem ocorrer hemorragias sistêmicas, ou não, dependendo de lesão no endotélio dos vasos. A presença de hemorraginas no veneno, capazes de lesar as células endoteliais, combinadas com a incoagulabilidade do sangue agravam o estado do paciente (Kouyoumdjian, 1990).

A incoagulabilidade sanguínea, que ocorre mais freqüentemente quando o acidente é causado por serpentes jovens, é atribuída ao consumo de fibrinogênio produzido pelas frações “*thrombin-like*”. Além disso, alguns venenos podem ativar os fatores X e II, acarretando a formação intravascular de trombina (Sano-Martins, 1990).

A trombocitopenia que ocorre em envenenamentos botrópicos se deve a vários fatores como a Botrocetina, que é um componente do veneno que atua sobre as plaquetas, produzindo agregação plaquetária ao mimetizar os componentes ativos da matriz subendotelial, causando a união do fator de von Willebrand com as glicoproteínas plaquetárias; a Trombocetina, que igualmente possui atividades de agregação; a efeitos fisiológicos normais das plaquetas em aderirem ao vaso endotelial lesado, e a produção de prostaglandina E₂ e tromboxano A₂ pela fosfolipase A₂, que também promovem a agregação plaquetária (Sano-Martins, 1990; Kamiguti et al., 1991; Hudelson e Hudelson, 1995a; Roodt et al., 1996).

3.3. Tratamento do envenenamento botrópico

3.3.1. Soro antibotrópico

O soro antibotrópico é constituído por uma solução purificada de imunoglobulinas e

destaca-se como o melhor e mais eficiente tratamento para os envenenamentos ofídicos, sendo utilizado há mais de 100 anos. Foi produzido na França, no final do século XIX, de forma pioneira para uso terapêutico por Calmette, Phisalix e Bertrand. Estes pesquisadores acreditavam no caráter universal deste imunoterápico, entretanto, Vital Brazil, no início do século XX demonstrou a especificidade dos soros antiofídicos, passando a produzir os soros para as serpentes brasileiras e determinando o abandono do medicamento importado da Europa. Esta mudança diminuiu drasticamente a mortalidade de humanos, que era estimada em 50% em 1901 para 25% em 1906. Após quatro décadas os índices se apresentavam entre 2,6 a 4,6% (Calmette, 1894; Soerensen, 1990; Wen, 2003).

Para as serpentes do gênero *Bothrops*, o tratamento instituído até três horas após a picada, evita a morte do ofendido. A terapia iniciada entre 24 e 48 horas após a picada, apenas salvaria a vida do paciente (Kocholaty et al., 1968; Rosenfeld, 1979, Viana, 1983; Schvartsman, 1992; Soerensen et al., 1993; Kosciunczuk et al., 1995; Roodt et al., 1996; Chippaux e Goyffon, 1998).

Para adequada distribuição e maior efetividade, sua infusão deve ser integralmente por via endovenosa. Da mesma forma que o soro ministrado por via endovenosa rapidamente fica biodisponível, as reações de hipersensibilidade instalam-se mais precocemente e de forma mais intensa. Os soros inoculados por via intramuscular ou subcutânea demoram cerca de quatro horas para que sejam completamente distribuídos (Kocholaty et al., 1968; Schvartsman, 1992; Soerensen et al., 1993; Kosciunczuk et al., 1995; Chippaux e Goyffon, 1998).

A terapia baseada no antiveneno é raramente contra-indicada, entretanto pode ser

inapropriada para pacientes com histórico de anafilaxia. Alguns centros médicos utilizam pré-tratamentos com o objetivo de reduzir a probabilidade de reações agudas adversas. O uso profilático de 0,25ml de adrenalina (1:1000) antes da infusão do soro diminuiu significativamente a ocorrência de reações adversas em humanos, além de ser uma droga de custo reduzido e sem contra-indicações (Premawardhena et al., 1999). O uso de prometazina (25mg) se mostrou ineficiente na profilaxia das reações anafiláticas e anafilactóides. Tal ineficácia pode ser responsabilizada pela falta de ação da droga sobre os receptores H₂ (Fan et al., 1999).

A aplicação pode ser feita juntamente com fluidos intravenosos variando com a severidade dos sintomas e número de ampolas a serem fornecidas. A dose a ser fornecida está diretamente relacionada aos sintomas clínicos e localização da picada. Não existe dose máxima de soro, sendo que a dose é calculada pelo monitoramento dos sintomas e eficácia do tratamento, através de exames neurológicos, físicos e de coagulopatias, descontinuando o tratamento com o fim do progresso do envenenamento (Hudelson e Hudelson, 1995b).

Com a correta aplicação do soro, a reversão dos efeitos sistêmicos é bem sucedida, embora a neutralização dos efeitos locais seja mais complicada, podendo originar seqüelas permanentes (Gutierrez e Lomonte, 1989). O uso de soro antibotrópico na dose de 10 vezes a dose indicada foi responsável pela reversão das alterações hemodinâmicas comuns no envenenamento (Santos et al., 2000). Um importante fator para a prevenção da ulceração dérmica local é o tempo que decorre desde a picada até o início do tratamento com o antiveneno (Villaruel et al., 1978/79; Viana, 1983). A avaliação dos quadros locais de 130 pacientes envolvidos em acidentes botrópicos realizada por Wen (2000), indicou que o uso do soro de 3 a 4 horas

após a picada não se mostrou eficaz na reversão do quadro local, diferentemente da boa ação notada nos parâmetros sistêmicos. Esta ineficácia não pode ser atribuída à dose insuficiente de soro, já que em todos os casos o soro foi adequadamente fornecido. Portanto o soro não neutraliza adequadamente as reações locais induzida pelo veneno mesmo quando administrado imediatamente após o acidente. Segundo Chacur et al. (2000) a ineficácia em reverter a sintomatologia local do veneno botrópico não se deve à ausência de anticorpos específicos, mas à rápida liberação de mediadores químicos responsáveis pela hiperalgesia e edema. A utilização do antiveneno para mensuração da hiperalgesia e formação de edema provocados pelo veneno de *B. jararaca* (5µg) em ratos foi ineficiente. Os animais que não receberam tratamento apresentaram os picos da formação do edema e hiperalgesia uma hora após a inoculação do veneno. O soro só foi efetivo quando aplicado antes da inoculação do veneno e nos grupos que receberam o imunoterápico logo após a inoculação ou depois de 15 minutos, sendo observada uma redução do edema, entretanto este efeito não foi completamente abolido (Picolo et al., 2002). O óbito é a conseqüência mais temida nos acidentes botrópicos, mais que a amputação de membros, que é muito freqüente (Ribeiro e Jorge, 1997).

3.3.2. Fitoterápicos

A exposição de pessoas e animais aos diversos tipos de envenenamento faz com que se busquem novas tentativas de obtenção de tratamentos provenientes de plantas. Algumas espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional possuem substâncias que atuam neutralizando os efeitos de venenos de serpentes. O uso de plantas para este fim é reconhecido desde o século XIX, sendo que recentemente passou a receber uma maior atenção da comunidade científica. Muitos são os relatos do sucesso obtido com tratamentos fitoterápicos,

embora os seus princípios ativos ainda não sejam totalmente conhecidos, assim como suas ações. Atualmente, este procedimento não foi abandonado, visto que ainda existem dificuldades na fabricação e distribuição do antiveneno, e da pronta assistência médica, além do custo elevado deste tratamento. Experimentos são conduzidos e, primariamente visam determinar a capacidade destas plantas, sejam fornecidas por via oral ou tópica, de evitar a morte dos animais envenenados, objetivando uma triagem daquelas que possuem uma melhor ação. Os efeitos de cada fração que constituem as plantas, normalmente não são avaliados (Brito e Brito, 1993; Pereira et al., 1993; Gottlieb e Borin, 1997; Mors, 1997; Rossi-Bergman et al., 1997; Mors et al., 2000; Harvey, 2003).

No Brasil, a pesquisa baseada na etnofarmacologia é um grande desafio, principalmente quando consideramos as condições geográficas no país. A vasta extensão territorial permite a ocorrência de vários tipos de relevo e clima, determinando a amplidão de vegetações. Destaca-se entre estas vegetações a floresta amazônica, riquíssima em espécies vegetais e alvo de desmatamentos e queimadas, que por sua vez levam à extinção de vegetais. Essa perda é irreparável e muitos deles desapareceram e desaparecerão da Terra antes de um estudo de seus componentes e suas ações farmacológicas (Brito e Brito, 1993).

3.3.2.1. *Curcuma longa*

A *Curcuma longa*, uma das 70 espécies do gênero, é um vegetal que pertence à família *Zingiberaceae*, perene, que se distribui pelas regiões tropical e subtropical do planeta. Extremamente cultivada em países asiáticos, possui grande importância econômica na Malásia, Indonésia e Índia, e devido a este fator, é muito estudada. Utilizada como especiaria, é responsável por conferir sabor

picante a pratos das mais variadas culinárias, principalmente a indiana, sendo um dos constituintes do curry, juntamente com a pimenta, o coentro, gengibre, cravo-da-índia, cardamomo, cominho e noz moscada, desempenhando importante papel na conservação dos alimentos. Na Medicina Ayurvedica e na Medicina tradicional Chinesa é utilizada para o tratamento de distúrbios hepáticos e biliares (Deters et al., 1999; Luper, 1999; Scott, 1999; Deters et al. 2000; Song et al., 2001; Deters et al. 2003; Mahakunakorn et al., 2003; Sasaki et al., 2003), imunomodulador (South et al., 1997; Xia et al., 2006), antineoplásico (Aratanehemuge et al., 2002; Kawamori, 1999), hipoglicêmico (Kuroda, 2005), anorexia, coriza, tosse, feridas, reumatismo e sinusite (Ammon e Wahl, 1991; Araújo e Leon, 2001; Singh et al., 2002).

Distribuída pelas regiões tropicais da Ásia e África, possui rizomas que variam das formas oblongas a ovais, dos quais são extraídas, após sua secagem, substâncias potencialmente medicinais, entre elas estão os pigmentos, óleo essencial, ácidos orgânicos, resina e amido. Utilizada para o tratamento de afecções estomacais, possui princípios como tônico estomacal, semelhante ao gengibre, estimulando a secreção de suco gástrico, facilitando a digestão de inapetentes e dispépticos. Também é utilizada nos casos de gastrite crônica e hipocloridria, além de possuir propriedades colagogas e carminativas (Luper, 1999; Singh et al., 2002).

O uso popular desta planta é também indicado no tratamento de cólicas gastrointestinais, flatulência, hemorragias, hematúria, dismenorréias, distúrbios biliares, coriza, tosse, reumatismo, sinusite, feridas de diabéticos, além das propriedades antiinflamatórias e hepatoprotetoras que são amplamente difundidas (Deters et al. 1999; Dinkova-Kostova e Talay, 1999; Luper, 1999; Deters et al. 2000; Rasmussen, et al., 2000; Araújo e Leon, 2001; Martins, 2001;

Song, et al., 2001; Aratanehemuge et al., 2002; Singh et al., 2002; Deters et al. 2003; Mahakunakorn et al., 2003; Ram et al. 2003; Sasaki et al., 2003).

Alguns estudos indicam a ação de componentes da *C. longa* no tratamento de leishmaniose. Tal uso se mostra como uma alternativa ao tratamento tradicionalmente instituído, visto que esse apresenta alta toxicidade além de não ser totalmente efetivo (Koide et al., 2002; Saleheen et al., 2002; Alves et al., 2003).

Para o melhor entendimento das ações da *C. longa*, obrigatoriamente se tornou necessário o fracionamento de seus componentes. O avançar das pesquisas permitiu melhor conhecimento de alguns princípios ativos como a curcumina, que pode chegar a constituir até cerca de 6% da raiz seca, além de óleos voláteis, como a turmerona, atlantona e zingiberona. Estes óleos podem ser os componentes ativos primários da *C. longa* em determinadas condições. Adicionam-se a estas substâncias açúcares (glicose e arabinose), proteínas e resinas (Luper, 1999; Singh et al., 2002).

As reações tóxicas da *C. longa* não são relatadas quando fornecidas para o homem e animais, assim como não se comprovou mortalidade ou teratogenicidade em qualquer dose de extrato alcoólico ou de curcumina, quando oferecidas a ratos, camundongos, porquinhos-da-Índia e macacos. A *Curcuma kwangsinensis*, espécie muito semelhante à *C. longa*, também apresentou toxicidade muito baixa, embora tenha sido possível o cálculo da DL₅₀ do extrato etanólico (86.8 ± 12g/kg) e do óleo essencial (1.10 ± 0.08g/kg) (Luper, 1999).

O ancestral uso da *C. longa* como terapêutico despertou a curiosidade de pesquisadores e a tornou fonte de pesquisas, principalmente aquelas que exploram as suas propriedades antiinflamatórias,

demonstrando a sua capacidade na reversão deste processo (Ammon e Wahl, 1991; Araújo e Leon, 2001; Jang et al., 2001; Kim et al., 2001; Singh et al., 2002; Lee et al., 2003; Ram et al., 2003; Shishodia et al., 2003).

Entre as diversas ações da *C. longa*, destaca-se a ação antiinflamatória. A curcumina possui a característica de modular a ação da ciclo-oxigenase em tecidos tumorais. A ciclo-oxigenase está envolvida na síntese de prostaglandinas e por consequência na cascata do ácido araquidônico. Diferentemente dos antiinflamatórios não esteróides, a curcumina não produz nenhuma toxicidade gastrointestinal, mesmo quando fornecida em altas doses, mostrando uma considerável vantagem sobre os agentes sintéticos. Outros estudos demonstram que a curcumina fornecida juntamente à dieta inibe significativamente a fosfolipase A₂, fazendo com que iniba a liberação de ácido araquidônico a partir de fosfolipídios, alterando tanto a atividade de ciclo-oxigenase quanto de lipo-oxigenase, modificando, por fim, os níveis de prostaglandina E₂. Existem evidências que indicam que o mecanismo de ação da curcumina não está limitado à inibição de prostaglandinas, alterando também a ação da atividade da lipo-oxigenase e de seus produtos (Kawamori et al., 1999; Braga et al., 2003).

O isolamento do ar-turmerone e β -turmerone, sesquiterpenóides dos rizomas de *Curcuma zedoaria*, permitiu a identificação da atividade destas substâncias como inibidoras da síntese de prostaglandinas a partir de lipopolissacarídeos, assim como a síntese de óxido nítrico. Tal atividade é dose-dependente e foi testada em cultura de macrófagos de camundongos (RAW264.7). Os índices de citotoxicidade do ar-turmerone e β -turmerone foram menores que o obtido para Cefecocib, que é um inibidor específico para ciclo-oxigenase-2 (Hong et al., 2002).

O fracionamento do extrato metanólico obtido dos rizomas da *C. zedoaria* resultou em compostos que se mostraram capazes de inibir a liberação do fator de necrose tumoral α (TNF- α), um dos responsáveis pela falência circulatória associada ao choque séptico, produzido por macrófagos ativadas. Tal propriedade explica parcialmente a atividade antiinflamatória da *C. zedoaria* (Jang et al., 2001). A atividade fagocitária de macrófagos se mostrou aumentada em culturas celulares (RAW264,7) que receberam frações parcialmente purificadas de *C. zedoaria* (Kim et al., 2001).

A ação antiveneno da *C. longa* foi pela primeira vez comprovada por Cherdchu e Kalrson (1983) na inativação parcial da neurotoxina de *Naja naja siamensis*. A eficiência deste vegetal também foi testada no envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops*. Fonseca et al. (2004) demonstraram a ação dos extratos aquosos de *C. longa* e do *Kalanchoe brasiliensis* na redução da formação do edema, halo hemorrágico e ulceração dérmica causados por veneno de *B. alternatus*. O mesmo efeito satisfatório não foi visto por Melo et al. (2005) quando testaram a aplicação tópica do extrato de *Calendula officinalis*.

Os estudos preliminares da *C. longa* e seus efeitos antiofídicos satisfatórios fizeram com que houvesse uma necessidade de se identificar os princípios bioativos deste vegetal. O fracionamento de rizomas e folhas feito por destilação deu origem a óleos voláteis que, por sua vez, submetidos às técnicas de cromatografia resultaram na identificação de 52 frações, sendo o ar-turmerone (figura 2) o componente presente em maior quantidade (Singh et al., 2002). A potencial ação antiveneno foi verificada por Ferreira et al. (1992), assim como as suas ações sobre linfócitos e células NK. O ensaio mensurou a atividade anti-hemorrágica do ar-turmerone sobre o veneno de *B. jararaca*, utilizando o método de Kondo et al. (1960). Os coelhos foram

inoculados, por via intradérmica, com a mistura de diferentes concentrações de ar-turmerone (30, 40, 50, 60 e 70 µg) e 10µg de veneno botrópico, diluídos em 100µg de salina. Os animais foram sacrificados três horas pós-inoculação. O fitoterápico foi eficiente na neutralização da formação dos halos hemorrágicos subcutâneos. Além disso, foi capaz de diminuir a resposta inflamatória com a redução de proliferação de linfócitos e inibição da atividade de células NK.

A ação do ar-turmerone em diminuir a letalidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi medida pela inoculação de camundongos por via intraperitoneal, de uma mistura de 12,5µg de veneno e de ar-turmerone (70, 60, 50, 40 e 30µg) em 100µg de salina. O resultado obtido mostrou que houve redução de até 70% da letalidade (Ferreira et al., 1992).

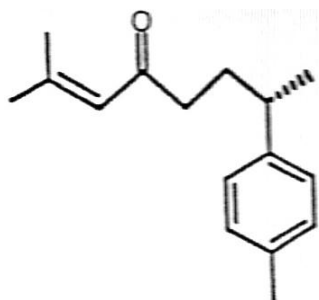


Figura 2 – Estrutura molecular do ar-turmerone

A aplicação do extrato aquoso de *C. longa* (10%) demonstrou desempenho superior quando comparado com outros tratamentos antiinflamatórios, sendo indicado como tratamento complementar ao soro antiofídico, diminuindo a intensidade da ulceração dérmica instalada em cães (Santos et al., 2003a).

Não existem dados na literatura referentes às propriedades medicinais do isocurcumenol (fig. 3), principalmente como tratamento de envenenamento ofídico, já que este princípio ativo foi isolado e identificado há poucos anos.

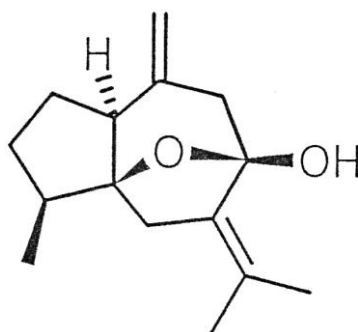


Figura 3 – Estrutura molecular do isocurcumenol

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

O experimento foi conduzido no biotério localizado no Hospital Veterinário, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte.

Foram utilizados 78 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia adultos, machos, pesando aproximadamente 1,0kg, fornecidos pelo setor de cunicultura da Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram identificados aleatoriamente, numerados na face interna da orelha, com caneta hidrográfica atóxica, e posteriormente alojados em gaiolas apropriadas (90cm x 90cm x 40cm), recebendo água e ração comercial peletizada (Coelhil R¹) *ad libitum* (Harkness e Wagner, 1993; Couto, 2002). Os animais foram submetidos a um período de adaptação e observação das condições de saúde por uma semana. Na rotina diária do manejo dos animais, no período da manhã, estavam inclusos a limpeza do local com água e a higienização das gaiolas, bebedouros automáticos e reposição do alimento consumido.

Os animais foram tratados conforme normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Código de Ética no Uso Científico de Animais. O protocolo deste estudo foi aprovado sem restrições pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG em 04/05/2005 sob o protocolo n°. 003/05 (Anexo 1).

Devido à grande diversidade de valores de referência hematológicos e bioquímicos, foi estabelecido um grupo de 30 coelhos, criados nas mesmas condições dos animais que efetivamente participaram do experimento. Os resultados obtidos foram utilizados para as comparações entre animais que não receberam veneno botrópico e aqueles envenenados. A escolha por fazer um grupo que forneceria os valores de referência se deu em função do reduzido peso dos animais submetidos ao envenenamento e posterior tratamento. A padronização dos pesos se fez necessária no

sentido de também padronizar o volume de veneno aplicado em cada coelho. Sendo assim, todos os animais receberam a mesma dose de veneno diluída em um volume de solução idêntico, minimizando a variação das lesões, já que volumes maiores podem causar lesões mais extensas (Calil-Elias et al., 2002).

4.2. Inoculação do veneno

O veneno dessecado e refrigerado de *Bothrops jararaca*, obtido por extração manual de espécimes de propriedade da Professora Maria Lúcia, foi diluído em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% na proporção de 5,0mg para cada 1,0ml de salina. Para determinação da dose foram utilizados 48 coelhos que receberam diferentes doses de veneno, sendo escolhida aquela que causou a instalação do quadro de sintomas locais em um curto período de tempo sem determinar a morte dos animais.

Após a tricotomia e anti-sepsia da face lateral do membro posterior direito, com auxílio de agulha hipodérmica, foi administrada, por via intradérmica, na profundidade de 0,5cm, a dose de 0,4mg/kg de peso corporal em 48 animais (figura 4). A dose de veneno aplicada teve como objetivo causar apenas alterações locais sem maiores envolvimento sistêmicos.

Dos 48 animais, 12 (dois de cada grupo) foram sacrificados, 48 horas após a inoculação do veneno, para avaliação dos exames anátomo-histopatológicos. Portanto, para avaliação dos sinais clínicos, exames hematológicos, coagulograma, bioquímica sérica e ELISA foram utilizados os valores médios de 36 animais.

¹ Socil



Figura 4 – Inoculação intradérmica do veneno de *Bothrops jararaca*

4.3. Grupos experimentais

Constituíram-se seis grupos experimentais, com seis animais cada, de acordo com as propostas de tratamento:

Tabela 1 – Esquema de tratamento

GRUPO	TRATAMENTO	INÍCIO DO TRATAMENTO	DOSE	VIAS DE ADMINISTRAÇÃO
I	Vaselina²	60 minutos	1,0mg cobrindo o local da inoculação (2 x dia por 15 dias)	Tópica
II	Ar-turmerone 1%³	60 minutos	1,0ml cobrindo o local da inoculação (2 x dia por 15 dias)	Tópica
III	Isocurcumenol 0,1%⁴	60 minutos	1,0ml cobrindo o local da inoculação (2 x dia por 15 dias)	Tópica
IV	Soro antibiótico⁵ + Ar-turmerone 1%³	30 minutos + 60 minutos	1,0ml para cada 5mg de veneno inoculado (dose única) Face lateral do membro posterior esquerdo + 1,0ml cobrindo o local da inoculação (2 x dia por 15 dias)	Subcutânea + Tópica
V	Soro antibiótico⁵ + Isocurcumenol 0,1%⁴	30 minutos + 60 minutos	1,0ml para cada 5mg de veneno inoculado (dose única) Face lateral do membro posterior esquerdo + 1,0ml cobrindo o local da inoculação (2 x dia por 15 dias)	Subcutânea + Tópica
VI	Soro antibiótico⁵	30 minutos	1,0ml para cada 5mg de veneno inoculado (dose única)	Subcutânea

² Vaselina

³ Isolado no Laboratório de Química da Escola de Veterinária de Hannover – Alemanha (Prof. Dr. Gerhard G. Habermehl)

⁴ Merck

⁵ Fundação Ezequiel Dias - FUNED

A utilização da vaselina como tratamento e meio de dissolução do ar-turmerone e isocurcumenol se deveu em função da orientação do Prof. Dr. Gerhard G. Habermehl. A manipulação das pomadas foi feita na Escola de Farmácia – UFMG.

4.4. Avaliação das lesões locais

Os exames para avaliação das lesões locais realizaram-se nos seguintes tempos: imediatamente antes da inoculação do veneno (tempo zero) visando o estabelecimento dos valores de referência, aos 15 e 30 minutos, uma, duas, quatro, seis, 12, 24, 30, 36, 48, 54 e 60 horas e aos três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, 11, 12, 13 e 14 dias, totalizado 25 exames (Figura 5).

Exames Clínicos (T)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
	Momentos	zero	15	30	1	2	4	6	12	24	30	36	48	54	60	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
min			horas											dias												

Figura 5 – Quadro dos momentos de realização dos exames clínicos

A estimativa do grau de edema foi mensurada através da realização de dobra cutânea na região que recebeu a inoculação do veneno botrópico. Para tal procedimento utilizou-se um paquímetro plástico, com o qual foram realizadas três medidas consecutivas e, posteriormente, calculada a média para fim de análise (figura 6a).

Os halos hemorrágicos e as ulcerações dérmicas foram avaliados com uma régua de gabaritos circulares, medindo-se o diâmetro da lesão em centímetros (figura 6b).

Todas as mensurações foram realizadas pela mesma pessoa, excluindo assim alterações nos critérios de avaliação.

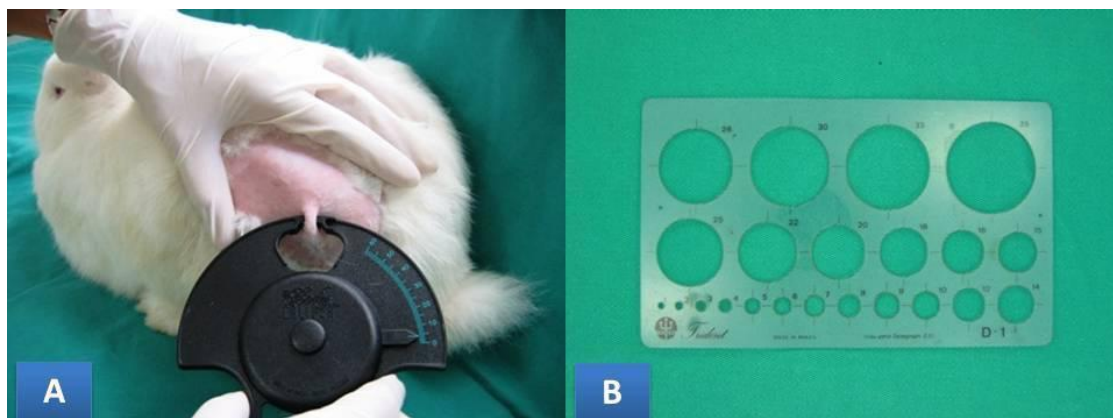


Figura 6 – (A) leitura da espessura da dobra cutânea, (B) régua de gabaritos circulares para a medida de halos hemorrágicos e ulcerações dérmicas.

4.5. Coleta de material

Para a avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos clínicos,

foram realizadas coletas sanguíneas nos seguintes tempos:

Coletas	1	2	3	4	5	6	7
Momentos	6 horas	48 horas	5 dias	9 dias	14 dias	21 dias	30 dias

Figura 7 – Quadro dos momentos de realização das coletas hematológicas

O sangue foi coletado na veia marginal da orelha (Harkness e Wagner, 1993; Malley, 1996) e parcelado em três amostras colocadas respectivamente em um tubo sem anticoagulante para a realização do tempo de coagulação; um tubo siliconizado contendo EDTA (sal dissódico do ácido etileno diamino tetra-acético) a 10% como anticoagulante para a realização do hemograma e contagem de plaquetas; e o terceiro e último tubo também siliconizado contendo como anticoagulante o citrato de sódio 10% para a realização da determinação dos tempos de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Em seguida, as amostras foram encaminhadas e processadas nos Laboratórios de Toxicologia e de Patologia Clínica do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG.

Os tempos de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativada (TTPa)

foram mensurados logo após as coletas com a intenção de diminuir as possíveis interferências decorrentes das condições de armazenamento.

4.6. Exames complementares

A contagem total de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, concentração de hemoglobina e volume globular, foram realizadas no laboratório TECSA em contador eletrônico ABX Vet⁶.

Foram realizados esfregaços sanguíneos para a contagem diferencial de leucócitos segundo Ferreira Neto et al. (1981).

O tempo de coagulação foi medido pelo método Lee e White (1913). A determinação dos tempos de protrombina⁷ e

⁶ ABX Diagnostics

⁷ REPLASTIN - Labtest

tromboplastina parcial ativada⁸ foi feita com banho-maria e cronômetro utilizando-se kits comerciais.

Os exames bioquímicos séricos, uréia⁹, creatinina¹⁰, creatina-fosfotransferase¹¹, aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT)¹² foram avaliados por colorimetria utilizando-se também kits comerciais.

4.7. Exames anatomopatológicos

Doze coelhos (dois de cada grupo) foram eutanasiados 48 horas após inoculação do veneno de *B. jararaca*, utilizando-se injeção de pentobarbital sódico¹³ na dose de 150mg/kg de peso vivo na veia marginal da orelha (Harkness e Wagner, 1993). A escolha deste momento para o sacrifício se deveu ao caráter agudo do envenenamento botrópico, procurando identificar as alterações locais e sistêmicas. Em seguida, os animais foram necropsiados, verificando-se a ocorrência de lesões macroscópicas. Coletou-se fragmentos de pele na região que recebeu a inoculação do veneno botrópico, do músculo adjacente à lesão cutânea (quadríceps vasto lateral), coração, pulmão, fígado, baço e rins. Posteriormente, foram imersos em formol 10% e encaminhados ao Setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG, onde foram embebidos em parafina, seccionados a 5µm e corados com hematoxilina e eosina.

4.8. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SAS (2000) e adotando-se um nível de significância de 5%. Antes de serem feitas

as análises de comparação entre médias foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para detectar, se as variáveis trabalhadas no estudo, apresentavam distribuição normal.

As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram submetidas a uma análise de variância seguida do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Friedman. Nos dados com distribuição normal foram realizadas análises paramétricas utilizando-se o teste de Skott-Knott para comparação entre as médias dos grupos em cada tempo (Sampaio, 1998).

⁸ APTTEST ELLAGICO - Wiener

⁹ Teste Colorimétrico Uréia Enzimática - Bioclin

¹⁰ Creatinina Teste Colorimétrico - Bioclin

¹¹ Creatina Fosfotransferase (CPK) - Doles

¹² Transaminases Colorimétrica - Bioclin

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação das lesões locais

Todos os animais após a inoculação do veneno botrópico se mostraram mais apáticos, relutantes em se movimentar e conseqüentemente, reduziram a ingestão de alimentos.

Após a inoculação intradérmica do veneno de *B. jararaca* ocorreu aumento estatisticamente significativo na espessura da dobra da pele dos animais. Este ocorreu de forma mais precoce em GII e GIII, sendo possível esta distinção em T1 (15 minutos). O surgimento de diferença na espessura com significância em fase posterior ocorreu em GV (isocurcumenol e soro antibotrópico) em T8 (24 horas). Em GI apenas houve diferença estatística em T7, T8 e T9 (12 a 30 horas). Nos animais do grupo III, este aumento se mostrou estatisticamente significativo em T1 (15 minutos), permanecendo esta diferença até T10 (36 horas). O tratamento com ar-turmerone (grupo II) não impediu o aumento da espessura, sendo que, após 15 minutos (T1) esta observação já se fazia significativa

permanecendo desta forma até 36 horas (T10), destacando-se os valores anotados uma e duas horas (T3 e T4) pós-inoculação, os maiores observados até este momento entre todos os grupos. Nos animais dos grupos IV, V e VI (grupos com tratamentos tópicos e com antiveneno), os maiores valores ocorreram em T8 e T9 (24 e 30 horas). No sétimo dia (T18) um animal do grupo IV apresentou uma medida da dobra cutânea maior que as observadas nos outros animais, alterando o valor médio desta variável neste grupo, sendo este valor o maior observado em todo o experimento (Tabela 2).

Entre os grupos observou-se que GI apresentou aumento significativo em T13 (60 horas), GII em T3 e T4 (uma e duas horas), GIII em T7 (12 horas), GIV nos tempos quatro, seis, sete, 11, 12 e 18 (duas, seis, 12, 48, 54 horas e sete dias), GV em T7 (12 horas), assim como GVI em T11, T12 e T13 (48, 54 e 60 horas).

Nenhum animal, até o último dia de observação, retornou aos valores de dobra cutânea medidos em T0.

Tabela 2 – Valores médios das dobras cutâneas (cm) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI		GII		GIII		GIV		GV		GVI	
T0	0,22	B a	0,26	B a	0,18	C a	0,23	D a	0,25	C a	0,26	B a
T1	0,29	B a	0,33	B a	0,32	A a	0,29	D a	0,30	C a	0,32	B a
T2	0,31	B a	0,36	A a	0,31	A a	0,34	D a	0,29	C a	0,28	B a
T3	0,33	B b	0,41	A a	0,33	A b	0,32	D b	0,30	C b	0,33	B b
T4	0,31	B b	0,41	A a	0,30	A b	0,37	C a	0,34	C b	0,31	B b
T5	0,32	B a	0,36	A a	0,34	A a	0,37	C a	0,33	C a	0,32	B a
T6	0,32	B a	0,35	A a	0,25	B b	0,33	D a	0,32	C a	0,39	A a
T7	0,42	A a	0,41	A a	0,36	A b	0,38	C b	0,32	C b	0,41	A a
T8	0,41	A a	0,38	A a	0,40	A a	0,42	B a	0,42	A a	0,42	A a
T9	0,41	A a	0,39	A a	0,37	A a	0,42	B a	0,42	A a	0,42	A a
T10	0,34	B a	0,36	A a	0,35	A a	0,33	D a	0,30	C a	0,35	A a
T11	0,33	B b	0,32	B b	0,32	A b	0,39	C a	0,31	C b	0,37	A a
T12	0,32	B b	0,32	B b	0,31	A b	0,37	C a	0,31	C b	0,37	A a
T13	0,31	B b	0,35	A a	0,34	A a	0,38	C a	0,28	C a	0,37	A a
T14	0,32	B a	0,31	B a	0,32	A a	0,36	C a	0,37	B a	0,37	A a
T15	0,31	B a	0,32	B a	0,33	A a	0,32	D a	0,36	B a	0,31	B a
T16	0,30	B a	0,30	B a	0,29	A a	0,29	D a	0,33	C a	0,32	B a
T17	0,31	B a	0,31	B a	0,30	A a	0,30	D a	0,29	C a	0,31	B a
T18	0,32	B b	0,30	B b	0,30	A b	0,48	A a	0,28	C b	0,33	B b
T19	0,32	B a	0,32	B a	0,32	A a	0,32	D a	0,32	C a	0,32	B a
T20	0,32	B a	0,29	B a	0,30	A a	0,31	D a	0,28	C a	0,29	B a
T21	0,32	B a	0,32	B a	0,26	B a	0,28	D a	0,30	C a	0,30	B a
T22	0,31	B a	0,32	B a	0,30	A a	0,32	D a	0,30	C a	0,30	B a
T23	0,32	B a	0,32	B a	0,30	A a	0,32	D a	0,30	C a	0,30	B a
T24	0,30	B a	0,33	B a	0,31	A a	0,34	D a	0,30	C a	0,30	B a
T25	0,29	B a	0,31	B a	0,31	A a	0,34	D a	0,30	C a	0,30	B a

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na linha e minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

As ocorrências de áreas de coloração violácea em torno do ponto de inoculação do veneno de *B. jararaca* foram de surgimento rápido e intenso, tendo sido notadas imediatamente após a inoculação do veneno em todos os animais (Fig. 8). Os animais do GII (ar-turmerone) apresentaram maior persistência dos halos hemorrágicos, ocorrendo até o terceiro dia (T14).

Os animais que apresentaram esta lesão por um período menor foram os pertencentes ao

GVI. Os maiores halos foram notados no GV (isocurcumenol e soro antibotrópico) as 12 e 24 horas após a inoculação (T7 e T8). Os animais dos grupos onde houve associação entre as frações da *C. longa* e o soro antibotrópico apresentaram maior grau de halos hemorrágicos médios mensurados durante todas as observações do experimento (tabela 3).

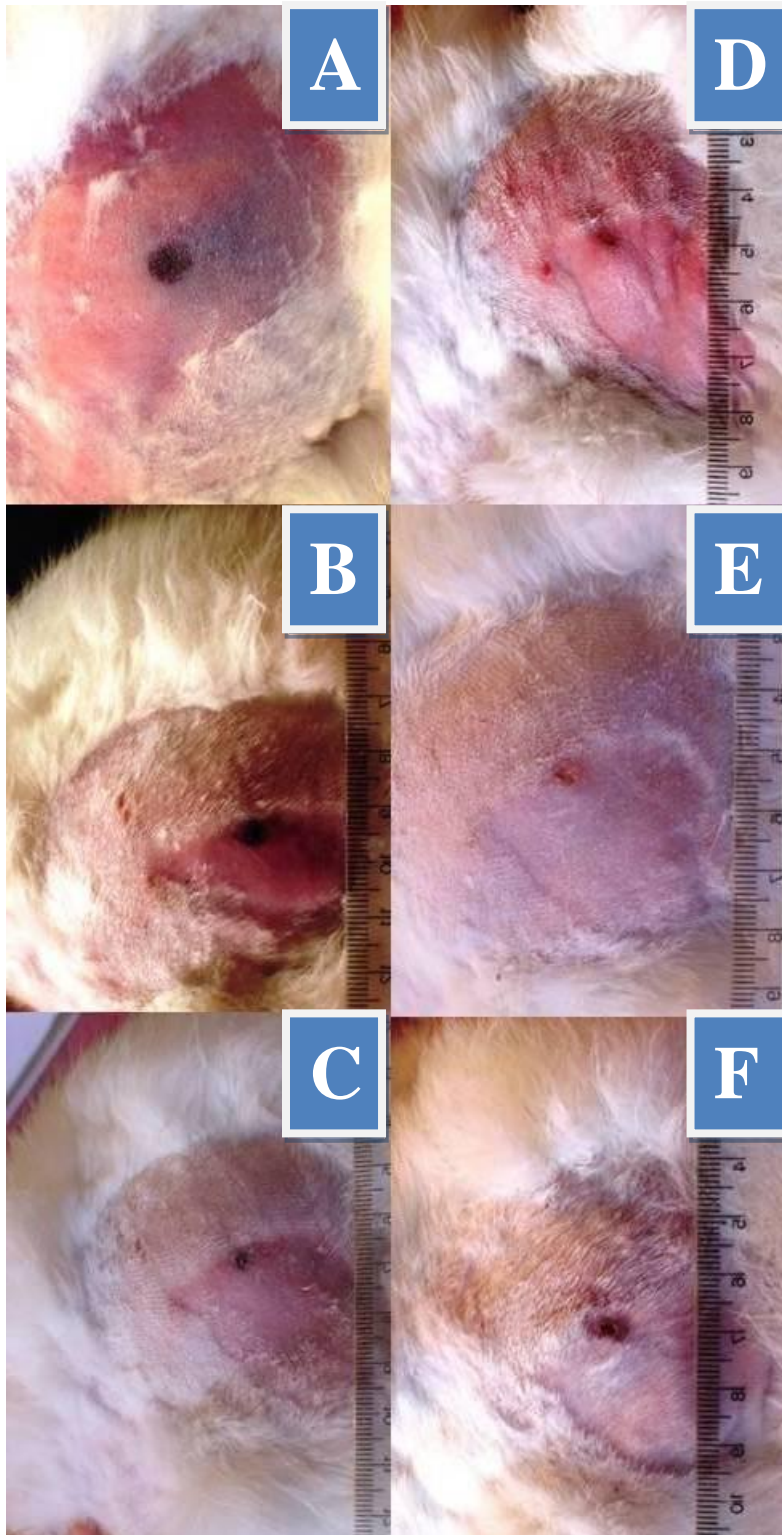


Figura 8 – Aspecto da lesão causada pela inoculação intradérmica do veneno de *Bothrops jararaca* em coelhos de GI. 10 minutos (A), 10 horas (B), 24 horas (C), 48 horas (D), 96 horas (E) e 168 horas (F) após a inoculação

Tabela 3 – Valores médios dos halos hemorrágicos (cm) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI		GII		GIII		GIV		GV		GVI	
T0	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T1	10,00	Aa	16,00	Aa	12,00	Aa	18,00	Aa	16,00	Aa	8,00	Aa
T2	12,00	Aa	14,00	Aa	12,00	Aa	18,00	Aa	15,00	Aa	12,00	Aa
T3	14,00	Aa	12,00	Aa	12,00	Aa	18,00	Aa	14,00	Aa	20,00	Aa
T4	14,00	Aa	12,00	Aa	10,00	Aa	18,00	Aa	14,00	Aa	15,00	Aa
T5	9,00	Aa	12,00	Aa	10,00	Aa	18,00	Aa	14,00	Aa	16,00	Aa
T6	9,00	Aa	12,00	Aab	9,00	Aab	15,00	Aab	12,00	Aab	14,00	Ab
T7	10,00	Aab	9,00	Aab	10,00	Aab	15,00	Aab	32,00	Ab	0,00	Aa
T8	0,00	Ab	6,00	Aab	9,00	Aab	12,00	Aab	30,00	Aab	0,00	Ab
T9	0,00	Aa	8,00	Aa	7,00	Aa	12,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T10	0,00	Aab	9,00	Aab	18,00	Aa	0,00	Ab	0,00	Ab	0,00	Ab
T11	0,00	Aa	8,00	Aa	9,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T12	0,00	Aa	8,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T13	0,00	Aa	5,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T14	0,00	Aa	5,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T15	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T16	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T17	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T18	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T19	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T20	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T21	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T22	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T23	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T24	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa
T25	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa	0,00	Aa

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

A média das ulcerações dérmicas dos animais do GVI se mostrou maior e significativamente diferente dos demais grupos em T6 (seis horas), assim como GV em T12 e T16 (54 horas e cinco dias).

O surgimento de ulcerações dérmicas ocorreu de forma mais precoce nos animais pertencentes ao GIV (ar-turmerone e soro antibotrópico), sendo possível notá-las aos 15 minutos após a inoculação (T1), embora

esta diferença não tenha sido significativa estatisticamente.

Houve diferença estatística em T6, no qual o GVI se diferenciou de GI e GIII. Em T7 os

grupos cinco e seis diferenciaram-se de GI. Em T12 o grupo cinco apresentou média maior e significativamente diferente de GII e em T16 a média do grupo cinco também foi maior que GIII (tabela 4).

Tabela 4 – Valores médios das ulcerações dérmicas (cm) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI		GII		GIII		GIV		GV		GVI	
T0	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,00	AB a	0,00	A a
T1	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,33	A a	0,00	A a	0,00	A a
T2	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,33	A a	0,00	A a	0,00	A a
T3	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,33	A a	0,00	A a	0,00	A a
T4	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,33	A a	0,00	A a	0,00	A a
T5	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,33	A a	1,33	A a	1,67	A a
T6	0,00	A a	1,67	A ab	0,00	A a	2,50	A ab	1,67	A ab	7,50	A b
T7	0,00	A a	3,50	A ab	1,50	A ab	4,33	A ab	6,83	A b	7,00	A b
T8	4,67	A a	3,50	A a	3,17	AB a	6,33	A a	6,83	A a	7,00	A a
T9	4,83	A a	3,50	A a	3,50	AB a	6,83	B a	6,83	A a	5,83	A a
T10	5,83	A a	3,67	A a	4,00	AB a	5,67	A a	6,50	A a	6,17	A a
T11	6,83	A a	3,67	A a	4,33	AB a	6,67	B a	6,50	BC a	6,33	A a
T12	6,00	A ab	3,67	A a	5,17	B ab	6,17	A ab	7,50	B b	6,33	A ab
T13	6,33	A a	2,83	A a	4,00	AB a	6,00	A a	7,00	A a	5,67	A a
T14	6,17	A a	4,17	A a	4,00	AB a	5,33	A a	6,33	A a	5,50	A a
T15	6,00	A a	4,17	A a	4,00	AB a	5,17	A a	6,83	A a	6,83	A a
T16	4,83	A ab	3,50	A ab	2,50	AB a	4,33	A ab	6,00	A b	5,33	A ab
T17	4,17	A a	3,50	A a	2,67	AB a	3,67	A a	5,67	A a	4,17	A a
T18	2,17	A a	3,17	A a	2,67	AB a	3,33	A a	4,67	A a	4,33	A a
T19	1,33	A a	2,50	A a	2,33	AB a	2,83	A a	2,17	A a	3,83	A a
T20	0,33	A a	3,00	A a	0,33	AB a	1,50	A a	1,50	A a	2,33	A a
T21	0,83	A a	0,33	A a	0,33	AB a	0,33	A a	2,00	A a	0,00	A a
T22	0,83	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,33	A a	1,00	A a	0,00	A a
T23	0,67	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,33	A a	0,50	A a	0,00	A a
T24	0,67	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a
T25	0,67	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a	0,00	A a

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

5.2. Avaliação da hemostasia

A avaliação do tempo de coagulação mostrou que em GI houve diferença em T1, T4 e T5 (seis horas, 48 horas e 14 dias). Em GII as maiores médias se deram em T2 e T4 (48 e nove dias), e as menores em T6 e T7 (21 e 30 dias), todas estatisticamente diferentes. Em GIII as menores médias foram observadas em T1 e T7 (seis horas e 30 dias). O grupo de animais tratados com ar-turmerone e soro antibotrópico mostrou diferença estatística em T1 (seis horas) e no grupo que recebeu a associação do imunoterápico e isocurcumenol a diferença se deu em T7 (30 dias).

Entre os grupos a diferença ocorreu no T1 (seis horas) em relação à GIV, em T6 no GII (21 dias), e em T7 (30 dias) em GI e GV.

O menor tempo de coagulação médio considerando-se todos os tempos foi constatado em GIII (isocurcumenol). Entretanto, os animais deste grupo apresentaram dificuldade maior no estancamento da hemorragia após a coleta de sangue para a realização dos exames hematológicos e bioquímicos (tabela 5).

Todas as médias permaneceram dentro dos valores de referência determinados para este experimento ($341,17 \pm 136,16$ s).

Tabela 5 – Valores médios do tempo de coagulação (segundos) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	225,50 ^{B a}	238,17 ^{B a}	194,33 ^{B a}	142,83 ^{B b}	242,17 ^{A a}	195,33 ^{A a}
T2	334,17 ^{A a}	322,33 ^{A a}	262,17 ^{A a}	260,50 ^{A a}	273,33 ^{A a}	259,83 ^{A a}
T3	278,67 ^{A a}	241,67 ^{B a}	231,50 ^{A a}	245,00 ^{A a}	238,17 ^{A a}	257,17 ^{A a}
T4	250,00 ^{B a}	328,33 ^{A a}	286,33 ^{A a}	285,83 ^{A a}	254,83 ^{A a}	235,50 ^{A a}
T5	223,33 ^{B a}	255,83 ^{B a}	239,00 ^{A a}	241,67 ^{A a}	248,00 ^{A a}	251,83 ^{A a}
T6	307,33 ^{A a}	220,00 ^{C b}	249,33 ^{A a}	223,00 ^{A a}	262,33 ^{A a}	274,17 ^{A a}
T7	299,17 ^{A a}	219,00 ^{C b}	195,60 ^{B b}	321,83 ^{A a}	190,83 ^{B b}	230,33 ^{A b}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na linha e minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

O tempo de protrombina permaneceu dentro dos parâmetros de referência estabelecidos durante todo o período experimental ($6,93 \pm 2,90$ s). Em T1 e T4 (seis horas e nove dias) houve diferença estatística entre GIV e GII, assim como em T5 (14 dias) entre GIII e GV, e em T6 (21 dias) entre GVI e GI.

GV a diferença ocorreu entre T1 e T4 e T7. No grupo de animais que receberam o soro antibotrópico a diferença significativa ocorreu entre T3 e T6 (tabela 6).

Em GI houve diferença entre T5 e T7. Os animais tratados com ar-turmerone (GII) apresentaram diferença entre T4 e T7. Em

O menor tempo de protrombina médio considerando-se todos os tempos foi constatado em GVI (soro antibotrópico), seguido por GIV (isocurcumenol), enquanto os maiores tempos médios foram obtidos nos animais de GII (ar-turmerone).

Tabela 6 – Valores médios do tempo de protrombina (segundos) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI			GII			GIII			GIV			GV			GVI		
T1	7.17	AB	ab	7.67	AB	a	7.67	A	ab	5.33	A	b	8.00	A	ab	6.33	AB	ab
T2	6.50	AB	a	6.33	AB	a	6.83	A	a	6.17	A	a	6.67	AB	a	5.50	AB	a
T3	6.67	AB	a	6.50	AB	a	6.83	A	a	6.00	A	a	6.83	AB	a	7.83	A	a
T4	6.83	AB	a	8.67	A	a	7.17	A	ab	6.20	A	b	9.00	A	ab	6.50	AB	ab
T5	8.17	A	ab	10.67	AB	ab	6.17	A	a	6.00	A	ab	5.83	AB	ab	4.67	AB	b
T6	7.33	AB	a	6.00	AB	ab	6.17	A	ab	6.33	A	ab	5.83	AB	ab	4.17	B	b
T7	5.67	B	a	5.00	B	a	6.17	A	a	6.17	A	a	5.17	B	a	5.67	AB	a

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na linha e minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

Todas as médias de tempo de tromboplastina parcial ativada se mostraram acima dos valores de referência estabelecidos para os animais deste experimento ($9,33 \pm 1,85s$).

Em GII os maiores tempos observados se deram em T5 e T6 (14 e 21 dias). Diminuições do tempo de tromboplastina parcial ativada ocorreram em GIII nos tempos cinco, seis e sete (14, 21 e 30 dias), em GIV nos tempos um e dois (6 e 48 horas) e em GV nos tempos seis e sete (21 e 30 dias) todos estatisticamente significativos. Em T1 (seis horas) houve diferença

estatística entre GV e GVI, sendo que o valor apresentado neste momento por GV foi o menor entre todas as médias. Em T2 (48 horas) os menores valores observados foram nos grupos II e IV, fato que se repetiu em T4 (9 dias). Em T6 (21 dias) os animais de GII (tratados com ar-turmerone voltaram a se diferenciar estatisticamente apresentando o menor tempo de tromboplastina parcial ativada nesta coleta. Aos 30 dias (T7) apenas o GI apresentou média estatisticamente diferente dos outros grupos (tabela 7).

Tabela 7 – Valores médios do tempo de tromboplastina parcial ativada (segundos) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI		GII		GIII		GIV		GV		GVI	
T1	26,83	A b	21,83	A c	28,00	A b	18,83	B c	35,33	A a	26,00	A b
T2	30,67	A a	20,00	B b	28,67	A a	20,33	B b	25,50	B a	25,50	A a
T3	29,00	A a	24,17	A a	25,50	A a	23,33	A a	24,67	B a	22,17	A a
T4	29,00	A a	21,67	A b	27,83	A a	26,40	A a	24,83	B b	23,00	A b
T5	31,83	A a	25,20	B c	25,00	B b	24,83	A b	25,17	B b	22,83	A b
T6	31,67	A a	29,20	B c	23,83	B b	23,83	A b	21,17	C b	21,67	A b
T7	26,33	A a	20,40	C c	20,67	B b	23,67	A a	20,50	C b	21,00	A b

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na linha e minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

A contagem total de plaquetas se mostrou acima dos parâmetros de referência ($279,96 \pm 124,92 \text{ mm}^3$) em GI no T1, G4 no T2 e T7, GV no T2, T5 e T6, e em GVI em T1, T2, T3 e T4. A trombocitopenia foi observada em GIII no T4 e em G4 em T7.

A maior contagem média de plaquetas totais foi obtida em GVI (soro antibotrópico), com diferença estatística em T1, T2, T3 e T4 (seis horas, 48 horas, cinco e nove dias), além de em GI em T1, em GIV em T3 e T7 e em GV em T1, T2, T3, T4, T5 e T6.

Os grupos que receberam o soro antibotrópico como tratamento único ou em associação com os tratamentos tópicos (GVI, GIV, GV) mostraram as maiores médias totais de plaquetas computados em todos os tempos. Tal fato pode ser confirmado pelas diferenças estatísticas de GIV em T7 (30 dias), GV em T4, T5 e T6 (nove, 14, 21 e 30 dias) e GVI em T1, T3 e T4 (seis horas, cinco e nove dias). As menores médias originaram-se dos grupos que receberam apenas as frações como tratamentos tópicos (GII e GIII) (tabela 8).

Tabela 8 – Valores médios de contagem de plaquetas (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	560.33 A a	311.67 A b	290.33 A b	358.83 C b	368.67 A b	598.83 A a
T2	298.67 B b	348.83 A a	215.00 A c	491.17 B a	410.17 A a	516.17 A a
T3	212.00 B c	362.33 A b	169.83 B d	304.33 A b	363.33 A b	625.00 A a
T4	294.33 B b	234.00 B b	128.83 C c	277.83 C b	387.00 A a	445.00 A a
T5	264.50 B b	206.50 B c	160.60 C d	330.50 B a	439.83 A a	399.33 B a
T6	287.50 B b	160.00 C d	201.67 B c	252.33 C b	498.33 A a	276.00 B b
T7	292.67 B b	148.20 C c	223.00 A b	493.33 A a	239.67 B b	310.17 B b

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na linha e minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

5.3. Avaliação da bioquímica sérica

A mensuração da uréia sérica revelou aumento estatisticamente significativo no T1 (seis horas) de todos os grupos com exceção do GV (isocurcumenol associado ao soro antibotrópico), no qual não houve diferença entre nenhum dos sete tempos. Em GI e GIII houve diferença em nos tempos quatro, cinco, seis e sete, em GII a diferença se deu em T6 e T7, enquanto a mesma ocorreu de T2 a T5 no grupo que recebeu a associação de ar-turmerone e isocurcumenol. No grupo seis os tempos um e dois foram

estatisticamente diferentes de T3 e T7 que por sua vez diferiram de T4, T5 e T6.

No primeiro tempo avaliado os grupos três e quatro diferiram dos demais, assim como GII e GIII nos tempos dois e três, GI e GII nos tempos quatro e cinco, GI e GIV no tempo seis e GI na última coleta aos trinta dias após a inoculação do veneno botrópico (tabela 9).

Os resultados obtidos na avaliação da uréia estiveram dentro dos valores de referência traçados para este experimento ($48,36 \pm 13,87\text{mg/dl}$).

Tabela 9 - Valores médios de uréia (mg/dl) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	24,31 ^{B b}	30,61 ^{A b}	34,74 ^{A a}	29,70 ^{A b}	23,63 ^{A b}	43,96 ^{A a}
T2	26,73 ^{B b}	41,74 ^{A a}	27,32 ^{A b}	22,90 ^{B b}	19,22 ^{A b}	39,15 ^{A a}
T3	26,34 ^{B b}	36,16 ^{A a}	22,49 ^{A b}	19,55 ^{B b}	22,86 ^{A b}	27,13 ^{B a}
T4	45,67 ^{A a}	41,46 ^{A a}	17,20 ^{B b}	20,30 ^{B b}	16,94 ^{A b}	16,53 ^{C b}
T5	37,08 ^{A a}	37,74 ^{A a}	18,12 ^{B b}	21,46 ^{B b}	17,29 ^{A b}	19,94 ^{C b}
T6	38,37 ^{A a}	21,89 ^{B b}	17,70 ^{B b}	27,49 ^{A a}	18,42 ^{A b}	18,76 ^{C b}
T7	41,72 ^{A a}	18,62 ^{B d}	16,29 ^{B c}	30,33 ^{A b}	20,53 ^{A c}	28,29 ^{B b}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na linha e minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

Os resultados obtidos na avaliação da creatinina estiveram dentro dos valores de referência traçados para este experimento ($1,01 \pm 0,20$ mg/dl).

Os aumentos de creatinina significativos ocorreram em T6 e T7 no grupo três. Em T1, o grupo cinco apresentou uma diminuição significativa, assim como o T6 de grupo dois (tabela 10).

Tabela 10 - Valores médios de creatinina (mg/dl) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	0.78 ^{A a}	0.84 ^{A a}	0.86 ^{A a}	0.93 ^{A a}	0.57 ^{B a}	0.87 ^{A a}
T2	0.80 ^{A a}	0.76 ^{A a}	0.88 ^{A a}	0.79 ^{A a}	0.68 ^{A a}	0.82 ^{A a}
T3	0.72 ^{A a}	0.74 ^{A a}	0.83 ^{A a}	0.76 ^{A a}	0.73 ^{A a}	0.85 ^{A a}
T4	0.65 ^{A a}	0.69 ^{A a}	0.76 ^{A a}	0.75 ^{A a}	0.71 ^{A a}	0.67 ^{A a}
T5	0.68 ^{A a}	0.64 ^{A a}	0.71 ^{A a}	0.66 ^{A a}	0.69 ^{A a}	0.65 ^{A a}
T6	0.76 ^{A a}	0.52 ^{B b}	1.19 ^{B b}	0.79 ^{A a}	0.69 ^{A a}	0.69 ^{A a}
T7	0.86 ^{A a}	0.60 ^{A a}	1.03 ^{B b}	0.77 ^{A a}	0.74 ^{A a}	0.74 ^{A a}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na linha e minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

A mensuração de ALT mostrou diferença estatística significativa em GIII (isocurcumenol) em T6 (21 dias). No GVI ocorreu diferença entre T1 (seis horas) e T4 (nove dias). Entre os tempos a diferença estatística ocorreu em T6 (21 dias) no grupo

três e em T7 (30 dias) houve diferença entre GI e GIII (tabela 11).

As médias de ALT do grupo três ficaram além dos valores de referência ($20,07 \pm 8,36$ U/ml) nos tempos cinco e seis, assim como em T4 no grupo cinco e em T6 em GVI.

Tabela 11 - Valores médios de alanina aminotransferase (U/ml) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	18,41 ^{A a}	21,48 ^{B a}	29,08 ^{A a}	23,54 ^{A a}	19,35 ^{A a}	14,89 ^{B a}
T2	24,89 ^{A a}	24,10 ^{A a}	22,80 ^{A a}	19,00 ^{A a}	19,33 ^{A a}	17,22 ^{B a}
T3	18,91 ^{A a}	24,68 ^{A a}	24,73 ^{A a}	20,44 ^{A a}	25,85 ^{B b}	20,49 ^{B b}
T4	18,52 ^{A a}	25,13 ^{A a}	26,81 ^{A a}	21,96 ^{A a}	30,69 ^{B b}	33,02 ^{A b}
T5	21,57 ^{A a}	23,77 ^{A a}	30,38 ^{A a}	20,88 ^{A a}	25,24 ^{A a}	21,38 ^{A a}
T6	19,19 ^{A c}	21,62 ^{B d}	46,88 ^{B a}	21,43 ^{A c}	25,28 ^{A b}	20,66 ^{A c}
T7	15,43 ^{A b}	20,44 ^{B b}	27,49 ^{A a}	20,49 ^{A a}	26,33 ^{B a}	25,22 ^{A a}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na linha e minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

A avaliação de AST dos coelhos envenenados com *B. jararaca* revelou diferença estatística significativa em GII (ar-turmerone) do tempo dois ao tempo cinco, em GIII apenas em T6 (21 dias), em GV nos tempos dois, quatro e sete e no GVI nos três primeiros tempos (6horas, 48horas e cinco dias).

Nos tempos três e quatro (cinco e nove dias) houve diferença estatística significativa entre GV (isocurcumenol e soro antibotrópico) e GVI (soro antibotrópico).

Em T6 (21 dias) o GIII (isocurcumenol) diferiu dos demais, enquanto no sétimo tempo (30 dias), GI e GII diferiram dos outros grupos (tabela 12).

Os animais de GII apresentaram médias superiores ao valor de referência ($18,01 \pm 7,07$ U/ml) nos tempos T2, T3, T4 e T5. Todos os tempos de GIII ficaram acima dos valores de referência, assim como o T1 de GIV, T4, T5, T6 e T7 de GV e em GVI os tempos quatro e sete.

Tabela 12 - Valores médios de aspartato aminotransferase (U/ml) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI		GII		GIII		GIV		GV		GVI	
T1	20,57	A a	24,05	A a	33,84	A a	27,27	A a	21,55	A a	16,21	A a
T2	28,49	A a	27,41	A a	25,86	A a	21,53	A a	21,50	A a	18,83	AB a
T3	21,23	A a	28,13	A a	28,39	A a	22,75	A a	29,77	A a	22,84	AB a
T4	20,39	A a	29,15	A a	30,99	A a	24,73	A a	35,91	A a	38,79	B a
T5	24,20	A a	27,01	A a	35,51	A a	23,25	A a	28,85	A a	23,86	AB a
T6	21,45	A a	24,17	A a	54,96	B b	24,22	A a	28,93	A a	22,95	AB a
T7	16,75	A a	22,76	A ab	31,77	A b	23,10	A ab	30,31	A ab	28,81	AB ab

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na linha e minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

A mensuração dos valores médios de CK mostrou que houve diferença estatística significativa em T2, T3 e T4 (48 horas, cinco e nove dias) em GII, em T6 (21 dias) em GIII, em T2 e T3 (48 horas e cinco dias) do grupo quatro e T1 e T3 (6 horas e cinco dias).

No tempo dois (6 horas) os grupos quatro e seis diferiram dos demais, no terceiro tempo GV foi estatisticamente diferente de GIV e GVI, que por sua vez se diferenciaram dos outros grupos. Em T4 (9 dias) os grupos cinco e seis foram diferentes dos demais, em

T5 os grupos dois e seis apresentaram diferença estatística. Os grupos dois e três foram diferentes nos tempos seis e sete (21 e 30 dias) (tabela 13).

Os animais do grupo que não recebeu tratamento (GI) apresentaram médias de CK superiores aos valores de referência ($154,41 \pm 61,42$ U.I./l) em T1, T4 e T6, assim como em T4 no grupo dois (ar-turmerone), em T1, T3 e T4 no grupo quatro e em T3 no grupo seis.

Tabela 13 – Valores médios de creatina fosfotransferase (U.I./l) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	242,72 ^{A a}	120,82 ^{B a}	150,18 ^{A a}	159,94 ^{A a}	240,15 ^{A a}	82,14 ^{A a}
T2	203,97 ^{A a}	161,75 ^{A a}	173,24 ^{A a}	89,73 ^{B b}	154,18 ^{B a}	70,96 ^{A b}
T3	118,64 ^{A b}	120,70 ^{A b}	213,36 ^{A b}	49,92 ^{B c}	286,26 ^{A a}	262,08 ^{A c}
T4	224,49 ^{A a}	256,37 ^{A a}	153,15 ^{A a}	192,52 ^{A a}	242,84 ^{B b}	130,72 ^{A b}
T5	139,54 ^{A a}	72,73 ^{B b}	150,44 ^{A a}	115,61 ^{A a}	113,53 ^{B a}	124,38 ^{A b}
T6	233,56 ^{A a}	122,27 ^{B b}	60,09 ^{B b}	197,98 ^{A a}	130,43 ^{B a}	106,75 ^{A a}
T7	208,17 ^{A a}	99,65 ^{B b}	77,57 ^{A b}	195,17 ^{A a}	108,07 ^{B a}	128,49 ^{A a}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na linha e minúsculas distintas na coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

5.4. Hematologia

As médias do número de hemácias ($10^6/\text{mm}^3$) dos animais do grupo controle foram de $5,44 \pm 0,55$. Somente em T2 e T3 (48h e quinto dia) ocorreu uma diminuição em todos os grupos, inclusive no grupo

tratado com soro antibotrópico, que mostrou os menores valores médios ($P \leq 0,05$) (Tabela 14). A partir de nove dias (T4) observou-se um aumento do número de hemácias em todos os grupos com exceção do grupo V (isocurcumenol e soro antibotrópico).

Tabela 14 – Valores médios da contagem de hemácias ($10^6/\text{mm}^3$) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	5,28 ^{Ac}	6,60 ^{Aa}	6,15 ^{Aab}	6,33 ^{Aab}	5,97 ^{Ab}	5,90 ^{Ab}
T2	4,92 ^{Bb}	5,18 ^{Bb}	4,97 ^{Bb}	5,67 ^{Ba}	5,22 ^{Cb}	4,80 ^{Cb}
T3	4,68 ^{Bbc}	5,01 ^{Bcd}	4,97 ^{Bb}	5,19 ^{Ba}	5,25 ^{Ca}	4,16 ^{Dd}
T4	5,08 ^{Ba}	5,19 ^{Ba}	5,36 ^{Ba}	5,39 ^{Ba}	5,29 ^{Ca}	4,18 ^{Db}
T5	5,46 ^{Aa}	5,39 ^{Ba}	5,46 ^{Ba}	5,53 ^{Ba}	5,57 ^{Ba}	5,17 ^{Ba}
T6	5,68 ^{Aa}	5,94 ^{Ba}	5,97 ^{Aa}	5,91 ^{Aa}	4,92 ^{Cb}	5,52 ^{Ba}
T7	5,79 ^{Aabc}	6,55 ^{Ba}	6,18 ^{Aab}	5,32 ^{Bc}	5,57 ^{Bbc}	6,26 ^{Aab}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott

As médias dos valores do hematócrito (%) dos animais do grupo controle foram de $34,00 \pm 2,88$. Os menores valores de hematócrito foram observados no quinto dia (T3) nos grupos I, II, III, IV e VI. Nesse tempo, o grupo VI, apresentou os menores

valores ($P \leq 0,05$) quando comparados com os grupos II, III, IV e V (Tabela 15). No nono dia, os valores de hematócrito do grupo VI, aumentaram, ficando diferente estatisticamente somente do grupo V. Na última coleta realizada 30 dias após a

inoculação do veneno, observou-se uma tendência de normalização, com retorno para valores os valores iniciais.

A média do grupo VI (30,14%) em T2; grupos I, III e VI (29,70%, 30,98% e

27,25% respectivamente) em T3; grupo VI (30,00%) em T4, e grupo V (30,50%) em T6 ficaram abaixo dos valores dos animais utilizados como controle.

Tabela 15 - Valores médios de hematócrito (%) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	34,10 ^{Bc}	41,40 ^{Aa}	37,15 ^{Ab}	36,85 ^{Ab}	35,35 ^{Abc}	36,83 ^{Ab}
T2	31,61 ^{Cabc}	33,04 ^{Cc}	30,59 ^{Bc}	33,55 ^{Ba}	31,51 ^{Babc}	30,14 ^{Ac}
T3	29,70 ^{Cab}	31,58 ^{Ca}	30,98 ^{Ba}	31,52 ^{Ba}	32,90 ^{Ba}	27,25 ^{Ab}
T4	33,30 ^{Bb}	33,68 ^{Ba}	32,03 ^{Babc}	33,57 ^{Bab}	34,08 ^{Aa}	30,00 ^{Bc}
T5	36,17 ^{Aa}	35,38 ^{Ba}	32,80 ^{Ba}	34,57 ^{Aa}	34,90 ^{Aa}	34,07 ^{Ba}
T6	36,97 ^{Aa}	35,74 ^{Ca}	35,53 ^{Aa}	35,90 ^{Aa}	30,50 ^{Bb}	35,83 ^{Ba}
T7	36,67 ^{Aab}	37,80 ^{Cab}	37,47 ^{Aab}	34,50 ^{Ab}	35,08 ^{Ab}	39,98 ^{Ba}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott

As médias dos valores da hemoglobina (g/dl) dos animais do grupo controle foram de $11,59 \pm 1,16$. Os animais tratados com vaselina (grupo I) apresentaram valores de hemoglobina abaixo dos valores de referência entre o segundo e quinto dias (10,17 g/dl e 10,15 g/dl respectivamente) (Tabela 16). Da mesma forma, o grupo tratado com isocurcumenol (grupo III)

também apresentou valores abaixo dos valores de referência no segundo dia (10,22 g/dl). O grupo tratado com isocurcumenol e soro antibotrópico (grupo V) mostrou baixos valores (9,83 g/dl), 21 dias após (T6). E finalmente, o grupo tratado com soro antibotrópico, apresentou valores abaixo dos da referência, no segundo (10,08g/dl), quinto (8,60g/dl) e nono (8,83g/dl) dias.

Tabela 16 - Valores médios de hemoglobina (g/dl) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	11,70 ^{A a}	13,70 ^{A a}	12,67 ^{A a}	12,53 ^{A a}	12,65 ^{A a}	11,05 ^{B b}
T2	10,17 ^{B a}	10,85 ^{B a}	10,22 ^{B a}	11,25 ^{A a}	11,05 ^{B a}	10,08 ^{B a}
T3	10,15 ^{B a}	10,82 ^{B a}	10,63 ^{B a}	11,00 ^{A a}	11,53 ^{A a}	8,60 ^{B b}
T4	11,23 ^{A a}	11,40 ^{B a}	10,90 ^{B a}	11,88 ^{A a}	11,97 ^{A a}	8,83 ^{B b}
T5	11,87 ^{A a}	11,95 ^{B a}	11,32 ^{C b}	12,08 ^{A a}	12,33 ^{A a}	11,78 ^{A a}
T6	12,27 ^{A a}	12,36 ^{C A}	12,37 ^{A a}	12,70 ^{A a}	9,83 ^{B b}	12,45 ^{A a}
T7	12,97 ^{A a}	13,22 ^{C b}	12,95 ^{A a}	11,50 ^{A a}	12,58 ^{A a}	13,40 ^{A b}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

Os valores de volume globular médio (μ^3) do grupo controle foi de $62,66 \pm 2,81$ (tabela 17). Em todos os grupos, até o nono dia (T4) não houve diferença estatística ($P > 0,05$). Foram observados valores de volume globular médio abaixo dos valores de

referência, nos grupos I e II aos 30 dias (T7), no grupo III aos 21 dias (T6), no grupo IV entre seis e 48 horas (T1 e T2) e no grupo V, as seis horas (T1). No grupo II (ar-turmerone) houve uma diminuição significativa entre 21 e 30 dias (T6 e T7).

Tabela 17 - Valores médios de volume globular médio (μ^3) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	65,2 ^{A a}	62,2 ^{A a}	59,9 ^{A a}	58,8 ^{A a}	59,1 ^{A a}	61,4 ^{A a}
T2	63,9 ^{A a}	63,4 ^{A a}	61,4 ^{A a}	59,3 ^{A a}	60,3 ^{A a}	61,7 ^{A a}
T3	63,6 ^{A a}	63,2 ^{A a}	62,4 ^{A a}	60,7 ^{A a}	62,8 ^{A a}	66,6 ^{A a}
T4	65,7 ^{A a}	64,9 ^{A a}	59,8 ^{A a}	62,3 ^{A a}	64,5 ^{A a}	72,0 ^{A a}
T5	66,3 ^{A a}	66,2 ^{A a}	60,1 ^{A b}	62,6 ^{A a}	62,6 ^{A a}	66,2 ^{A a}
T6	65,2 ^{A a}	60,5 ^{B b}	59,8 ^{A b}	60,9 ^{A a}	62,1 ^{A a}	65,1 ^{A a}
T7	58,5 ^{A a}	57,9 ^{B b}	60,6 ^{A a}	64,9 ^{A a}	63,1 ^{A a}	64,1 ^{A a}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

Os valores hemoglobina globular média (pg) foram de $21,58 \pm 1,23$ no grupo controle. Somente os grupos III em T4 (20,33 pg) e V em T6 (20,02 pg) apresentaram valores

abaixo dos valores de referência. Nos grupos II, III e VI, a hemoglobina globular média não sofreu alteração entre os tempos (Tabela 18).

Tabela 18 - Valores médios de hemoglobina globular média (pg) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	22,27 ^{AB a}	21,00 ^{A ab}	20,56 ^{A b}	20,40 ^{A b}	21,07 ^{AB ab}	27,76 ^{A ab}
T2	21,12 ^{B a}	21,11 ^{A a}	20,75 ^{A a}	20,48 ^{AB a}	20,87 ^{AB a}	21,14 ^{A a}
T3	21,72 ^{A a}	21,65 ^{A a}	21,42 ^{A a}	21,20 ^{ABC a}	22,02 ^{AB a}	20,71 ^{A a}
T4	22,13 ^{AB a}	21,99 ^{A a}	20,33 ^{A a}	22,05 ^{C a}	22,63 ^{A a}	21,16 ^{A a}
T5	21,75 ^{A a}	22,32 ^{A a}	20,71 ^{A a}	21,88 ^{BC a}	22,12 ^{AB a}	22,93 ^{A a}
T6	21,61 ^{AB ab}	20,88 ^{A ab}	20,79 ^{A ab}	21,56 ^{ABC ab}	20,02 ^{B a}	22,63 ^{A b}
T7	22,43 ^{A a}	20,35 ^{A ab}	20,96 ^{A a}	21,65 ^{BC a}	22,64 ^{A a}	21,51 ^{A a}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

Os valores da concentração de hemoglobina globular média no grupo controle foram de $34,18 \pm 1,17\%$. Os animais do grupo VI apresentaram valor médio significativamente menor, que os dos outros grupos, no quinto dia (T3). No nono dia (T4) esse valor

diminuiu significativamente e manteve-se significativamente menor (29,38 %) quando comparado aos outros grupos (Tabela 19). Ressalta-se que esse valor permaneceu fora dos valores de referência.

Tabela 19 - Valores médios da concentração de hemoglobina globular média (pg) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	34,16 ^{A a}	33,76 ^{A a}	34,34 ^{A a}	34,70 ^{A a}	35,65 ^{A a}	34,57 ^{A a}
T2	33,10 ^{B a}	33,30 ^{A a}	33,81 ^{A a}	34,55 ^{A a}	34,60 ^{A a}	34,23 ^{A a}
T3	34,16 ^{A a}	34,28 ^{A a}	34,31 ^{A a}	34,94 ^{A a}	35,08 ^{A a}	31,78 ^{B b}
T4	33,71 ^{B b}	33,86 ^{A b}	33,96 ^{A b}	35,40 ^{A a}	35,12 ^{A a}	29,38 ^{C c}
T5	32,82 ^{B b}	33,76 ^{A b}	34,48 ^{B c}	34,96 ^{A a}	35,33 ^{A a}	34,63 ^{A a}
T6	33,17 ^{B b}	34,56 ^{B c}	34,87 ^{B a}	35,40 ^{A a}	32,30 ^{B b}	34,78 ^{A a}
T7	35,43 ^{A a}	34,96 ^{B c}	34,60 ^{B a}	33,34 ^{B b}	35,86 ^{A a}	33,53 ^{A b}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

O número total de leucócitos foi de $5528,62 \pm 1948,95$ nos animais do grupo controle. Os grupos IV, V e VI não apresentaram variação no número de leucócitos nos diferentes tempos estudados (Tabela 19). Os animais do grupo I mostraram leucopenia no nono dia (T4),

apresentando valores significativamente menores quando comparados aos valores dos outros grupos. Já os animais do grupo III (isocurcumenol) apresentaram os maiores valores médios do número total de leucócitos entre 48 horas e o quinto dia.

Tabela 20 - Valores médios da contagem de leucócitos totais (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	4490,00 ^{A a}	5828,33 ^{A a}	5408,33 ^{A a}	5616,67 ^{A a}	5676,67 ^{A a}	5176,67 ^{A a}
T2	6088,33 ^{A a}	6701,67 ^{A a}	8251,67 ^{B b}	6610,00 ^{A a}	4711,67 ^{A a}	6546,67 ^{A a}
T3	5916,67 ^{A a}	5845,00 ^{A a}	8270,00 ^{B b}	6518,33 ^{A a}	5680,00 ^{A a}	6233,33 ^{A a}
T4	3707,88 ^{B b}	5630,00 ^{A a}	6588,33 ^{A a}	6675,00 ^{A a}	5748,33 ^{A a}	4666,67 ^{A a}
T5	5328,33 ^{A a}	6556,67 ^{A b}	6422,00 ^{A b}	5801,67 ^{A a}	5806,67 ^{A a}	5238,33 ^{A a}
T6	6930,00 ^{A a}	7076,00 ^{B b}	5986,67 ^{A a}	6718,33 ^{A a}	4666,67 ^{A a}	6338,33 ^{A a}
T7	7780,00 ^{A b}	7354,00 ^{B b}	6491,67 ^{A a}	6500,00 ^{A a}	5146,67 ^{A a}	7863,33 ^{A b}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

Os valores absolutos de neutrófilos (mm^3) no grupo controle foram $2746,70 \pm 1433,92$. Nos grupos II, III, IV e V não houve diferença estatística nos diferentes tempos

(Tabela 20). O grupo I após a inoculação do veneno e especialmente no nono dia (T4), houve uma diminuição no número absoluto dos neutrófilos.

Tabela 21 - Valores médios da contagem de neutrófilos (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI		GII		GIII		GIV		GV		GVI	
T1	1726,12	AB a	2875,92	A a	2350,08	A a	2375,85	A a	2752,65	A a	2376,23	A a
T2	1980,60	A a	3031,75	A a	3437,35	A a	2749,32	A a	2019,85	A a	2935,75	A a
T3	3111,73	AB a	2694,40	A a	3652,38	A a	2490,18	A a	2211,63	A a	2911,17	A a
T4	1122,53	B a	2621,82	A a	2838,17	A a	2225,52	A a	2205,58	A a	2016,67	A a
T5	2606,55	AB a	2478,32	A a	2124,73	A a	2356,60	A a	2411,92	A a	2004,70	A a
T6	3660,30	AB a	2621,26	A ab	2185,42	A ab	1933,68	A ab	1726,67	A b	2549,85	A ab
T7	3691,95	B a	3183,58	A ab	2820,85	A ab	2343,33	A ab	1924,17	A b	1924,17	B b

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

O valor de referência para bastonetes foi de $71,57 \pm 25,77$. O número absoluto dos bastonetes foi igual estatisticamente ($P > 0,05$) nos diferentes tempos dos grupos

II, IV, V e VI. Os maiores valores foram observados no grupo VI (1286,83). Ressalta-se que neste momento não houve aumento dos neutrófilos nem aumento dos leucócitos.

Tabela 22 - Valores médios da contagem de bastonetes (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	5,15 ^{A a}	82,58 ^{A ab}	110,17 ^{AB b}	65,82 ^{A ab}	93,15 ^{A ab}	63,95 ^{A ab}
T2	49,38 ^{AB a}	115,92 ^{A a}	98,32 ^{AB a}	61,57 ^{A a}	120,65 ^{A a}	115,48 ^{A a}
T3	22,28 ^{AB a}	89,62 ^{A a}	98,48 ^{AB a}	159,38 ^{A a}	127,52 ^{A a}	1286,83 ^{A b}
T4	22,06 ^{AB a}	96,75 ^{A a}	144,30 ^{B a}	55,43 ^{A a}	51,90 ^{A a}	73,33 ^{A a}
T5	67,57 ^{B a}	104,93 ^{A a}	33,20 ^{A a}	79,78 ^{A a}	62,22 ^{A a}	80,88 ^{A a}
T6	31,48 ^{AB a}	62,66 ^{A a}	67,35 ^{AB a}	81,18 ^{A a}	58,33 ^{A a}	141,73 ^{A a}
T7	95,62 ^{B a}	66,86 ^{A a}	121,32 ^{B a}	46,67 ^{A a}	79,12 ^{A a}	79,12 ^{A a}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

Os valores absolutos do número de linfócitos foram de $3411,82 \pm 1258,53$. Os grupos II, III, IV, V e VI não apresentaram diferença significativa nos diferentes tempos. Somente o grupo I (vaselina)

apresentou um aumento significativo. As médias dos animais do grupo I em T1 e T4 (seis horas e nove dias) assim como o grupo VI no T3 (quinto dia) permaneceram abaixo dos valores de referência.

Tabela 23 - Valores médios da contagem de linfócitos (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	1099,25 ^{A a}	2746,23 ^{A ab}	2977,78 ^{A b}	3149,43 ^{A b}	2754,42 ^{A ab}	2615,32 ^{A ab}
T2	3921,83 ^{B a}	3466,32 ^{A a}	4555,58 ^{A a}	3683,02 ^{A a}	2537,23 ^{A a}	3389,65 ^{A a}
T3	2682,22 ^{AB a}	2998,52 ^{A a}	4271,82 ^{A a}	3742,17 ^{A a}	3271,23 ^{A a}	2011,67 ^{A a}
T4	10111,75 ^{AB a}	2830,63 ^{A a}	3461,82 ^{A a}	3468,20 ^{A a}	3455,02 ^{A a}	2523,33 ^{A a}
T5	2539,12 ^{AB a}	3234,97 ^{A a}	3155,70 ^{A a}	3311,87 ^{A a}	3275,68 ^{A a}	2467,58 ^{A a}
T6	3113,08 ^{AB a}	4264,42 ^{A a}	3628,92 ^{A a}	4651,35 ^{A a}	2815,00 ^{A a}	3546,68 ^{A a}
T7	3947,97 ^{B a}	3980,78 ^{A a}	3473,08 ^{A a}	4066,67 ^{A a}	3049,52 ^{A a}	3049,52 ^{A a}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

O valor de referência para basófilos foi de $27,44 \pm 7,7$. Os grupos I, III, V e VI não mostraram diferença significativa nos

distintos tempos estudados (Tabela 24). Nos grupos II e IV, os basófilos apresentaram diferenças significantes nos valores médios.

Tabela 24 - Valores médios da contagem de basófilos (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	25,60 ^{A a}	41,27 ^{ABC a}	0,00 ^{A a}	9,17 ^{ABCD a}	29,33 ^{A a}	59,15 ^{A a}
T2	12,95 ^{A a}	0,00 ^{A a}	62,77 ^{A a}	61,38 ^{D a}	7,98 ^{A a}	51,10 ^{A a}
T3	0,00 ^{A a}	0,00 ^{A a}	86,72 ^{A a}	20,20 ^{ABCD a}	22,30 ^{A a}	14,17 ^{A a}
T4	0,00 ^{A a}	14,97 ^{B a}	20,30 ^{A a}	10,73 ^{AB a}	0,00 ^{A a}	6,67 ^{A a}
T5	31,40 ^{A a}	81,20 ^{C a}	10,07 ^{A a}	0,00 ^{A a}	30,92 ^{A a}	9,88 ^{A a}
T6	42,95 ^{A a}	53,90 ^{C a}	13,75 ^{A a}	21,55 ^{ABCD a}	6,67 ^{A a}	66,60 ^{A a}
T7	7,97 ^{A a}	32,42 ^{ABC a}	31,85 ^{A a}	8,33 ^{ABC a}	20,93 ^{A a}	20,93 ^{A a}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

Os valores médios dos monócitos foram de $60,43 \pm 31,97 \text{ mm}^3$. O grupo I apresentou médias em T1, T2 e T3 (entre seis horas e cinco dias) acima dos valores de referência, assim como o grupo III em T3 e T4 (entre

cinco e nove dias), e o grupo IV em T3 (cinco dias). Valores abaixo dos valores de referência foram vistos nos grupos II (aos 30 dias), III e VI (as seis horas), V (48 horas) e VI (aos cinco dias).

Tabela 25 - Valores médios da contagem de monócitos (mm^3) de coelhos após inoculação do veneno de *Bothrops jararaca* tratados com vaselina (GI), ar-turmerone 1% (GII), isocurcumenol 0,1% (GIII), ar-turmerone 1% e soro antibotrópico (GIV), isocurcumenol 0,1% e soro antibotrópico (GV) e soro antibotrópico (GVI) em diferentes tempos.

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
T1	112,22 ^{A a}	82,33 ^{A a}	31,90 ^{A a}	16,40 ^{A a}	47,12 ^{A a}	62,02 ^{A a}
T2	110,62 ^{A a}	87,68 ^{A a}	97,65 ^{A a}	54,72 ^{A a}	25,95 ^{A a}	54,68 ^{A a}
T3	100,43 ^{A ab}	52,13 ^{A ab}	145,63 ^{A a}	106,40 ^{A ab}	47,32 ^{A ab}	9,50 ^{A b}
T4	52,16 ^{A a}	59,43 ^{A a}	123,75 ^{A a}	53,45 ^{A a}	35,83 ^{A a}	46,67 ^{A a}
T5	83,70 ^{A a}	25,58 ^{A a}	27,97 ^{A a}	53,42 ^{A a}	25,93 ^{A a}	13,62 ^{A a}
T6	82,18 ^{A a}	73,76 ^{A a}	59,63 ^{A a}	30,57 ^{A a}	60,00 ^{A a}	33,47 ^{A a}
T7	36,50 ^{A a}	90,36 ^{A a}	44,57 ^{A a}	35,00 ^{A a}	72,93 ^{A a}	72,93 ^{A a}

Médias seguidas com letras maiúsculas distintas na coluna e minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) mediante o teste de Scott-Knott.

5.5. Achados de necropsia

Durante a realização da necropsia não foram observadas lesões macroscópicas no

coração, rins, cavidade torácica. Em todos os grupos os animais apresentavam fígado congesto e pulmões com edema e hemorragias petequiais subfocais discretas.

Todos os animais apresentaram lesões puntiformes circundadas por halos

hemorrágicos nos locais que receberam a inoculação do veneno botrópico (fig. 9).



Figura 9 – Necropsia do animal 6 (Grupo I). Face lateral do membro posterior direito.

5.6. Histopatologia

Não foram observadas alterações nos diversos órgãos coletados para exame, com exceção do fígado e da pele.

As lesões hepáticas se limitaram às degenerações por glicogênio intensas e difusas. Esse tipo de lesão foi observada em todos os animais (fig. 10).

A pele de todos os animais apresentaram lesões devido à inoculação do caracterizadas por epidermite e dermatite necrótica granulocítica aguda e extensa e ulceração dérmica fibrinóide da parede vascular. As lesões se apresentaram em intensidade muito semelhante, não podendo ser observada diferenças entre os fragmentos estudados (fig.11).

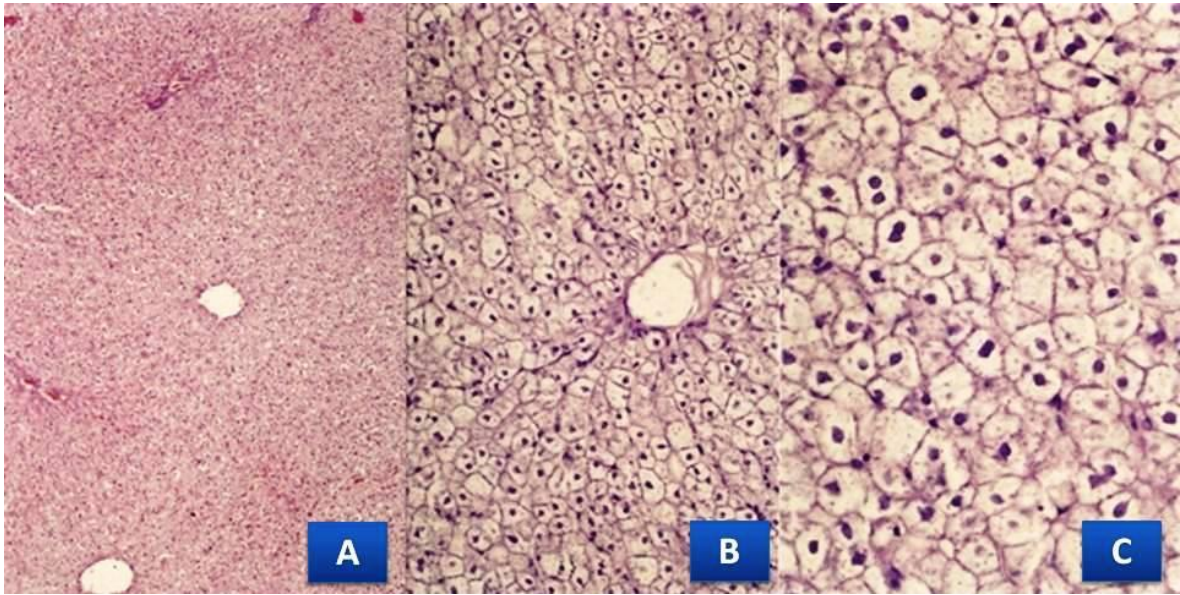


Figura 10 – Fotomicrografia do fígado de um coelho do Grupo I, demonstrando degeneração por glicogênio intensas e difusas (Hematoxilina e Eosina, 100x (A), 200x (B) e 400x (C)).

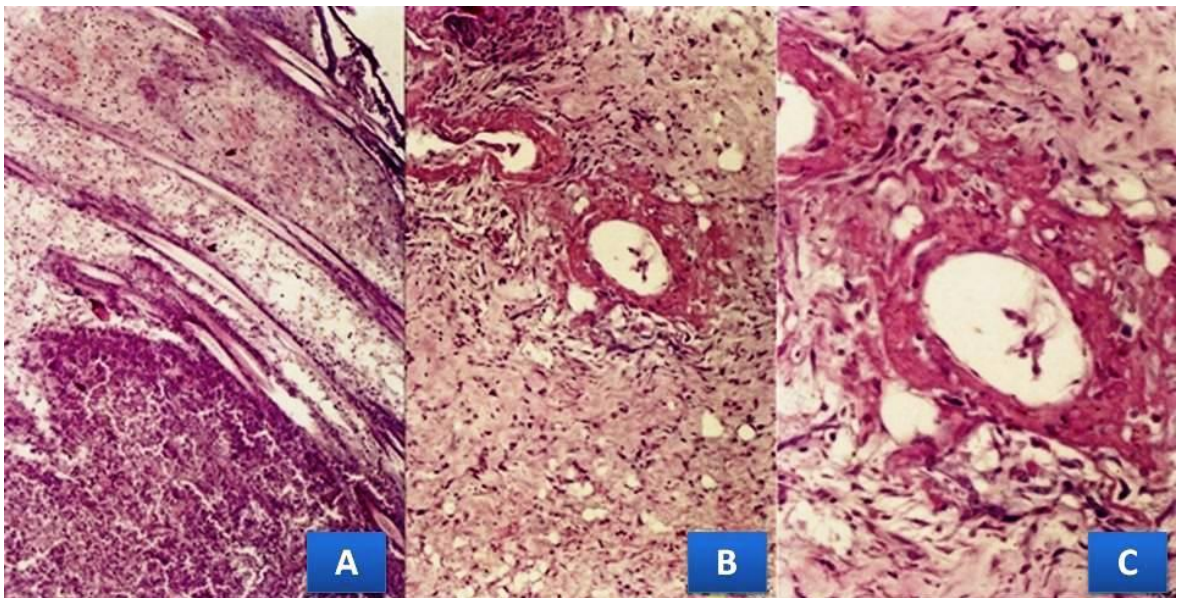


Figura 11 – Fotomicrografia da pele de um coelho do Grupo I, demonstrando epidermite e dermatite necrótica granulocítica aguda e extensa e ulceração dérmica fibrinóide da parede vascular (Hematoxilina e Eosina, 100x (A), 200x (B) e 400x (C)).

6. DISCUSSÃO

6.1. Lesões locais

A relutância à movimentação, assim como a apatia e a redução da ingestão de alimentos podem ser justificadas pela intensa dor relatada por outros pesquisadores e atribuídas a liberação de mediadores inflamatórios (Araújo & Belluomini, 1960; Araújo et al., 1963; Viana, 1983; Trebien & Calixto, 1989; Bicudo, 1994; Sano-Martins et al., 1995; Soerensen et al., 1995; Takahira, 1999; Jácome, 2002; Santos, 2002; Silva Junior, 2003; Oliveira, 2005).

A formação do edema, neste experimento mensurada pela dobra cutânea, foi imediata sendo notada na primeira medição feita após a inoculação de veneno. Sua formação é multifatorial, estando vários mediadores envolvidos, entre eles histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos e eicosanóides derivados do ácido araquidônico. Assim sendo, esta variedade de substâncias envolvidas tornam o tratamento muito complexo, com diversos pontos a serem considerados para um resultado efetivo. Além do mais, a instantânea liberação destes mediadores determinam que quanto mais rápida for a instituição do tratamento, maior a possibilidade de sucesso (Homma & Tu, 1971; Gutiérrez & Lomonte, 1989; Selistre et al., 1990, Schvartsman, 1992, Chacur et al., 2000, Petricevich et al., 2000, Wen, 2000). O veneno possui ação anticoagulante e hemorrágica, que também influenciam na atividade inflamatória. A formação de trombos na microvasculatura causa a hipóxia e conseqüente agravamento do edema e ulceração dérmica tecidual. A lesão do endotélio leva ao extravasamento de líquido para o interstício (Schvartsman, 1992). Portanto o edema ocorre por efeito das toxinas hemorrágicas, aumento da permeabilidade vascular, liberação de histamina, fosfolipase A₂ que libera o ácido araquidônico dos fosfolipídeos das

membranas iniciando a síntese de prostaglandinas, liberação de cininas devido à atuação de proteases e componentes do sistema de complemento, participantes da reação inflamatória (Gutiérrez & Lomonte, 1989; Miller & Tu, 1989). O edema de formação imediata também foi observado por Trebien & Calixto (1989) e Santos (2002).

Os maiores graus de edema ocorreram entre T7 e T9 (seis e 30 horas) corroborando com os achados de Santos (2002) em cães e Oliveira (2005) em bovinos, exceto nos animais que receberam ar-turmerone (GII), que demonstraram aumento semelhante entre uma e duas horas (T3 e T4), sendo significativamente estatística a partir de T1 (15 minutos).

Esta precocidade pode se dever às alterações vasculares. As propriedades antiinflamatórias do ar-turmerone já são há muito estudadas, sendo que a curcumina interfere com o metabolismo do ácido araquidônico nas vias da lipo e ciclooxigenase (Araújo e Leon, 2001; Braga et al., 2003) Chaves et al. (1995) definiram que o veneno botrópico determina a formação de edema pela sua interferência sobre a cascata inflamatória induzindo a liberação de eicosanóides ou pela ação sobre a microvasculatura, permitindo assim o extravasamento de líquido para o interstício. A última ação deve-se principalmente às metaloproteinases, que por sua vez podem até mesmo levar a hipovolemia e síndrome compartimental, tamanha é a lesão imposta à vasculatura (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Farsky et al., 1997). O fornecimento de antiinflamatórios como a indometacina impediram a formação do edema induzido pelo veneno de *B. asper* (Chaves et al, 1995). Neste experimento o ar-turmerone se mostrou ineficiente na reversão da formação do edema.

O antiveneno se mostrou ineficiente na reversão do edema, principalmente entre T6

e T14 (seis horas a três dias). Tal fato já fora relatado por Gutiérrez et al. (1986). O soro impede a continuidade das lesões a partir do momento que o mesmo é inoculado, não tendo ação sobre os danos anteriormente causados, daí a necessidade do tratamento precoce.

O isocurcumenol mostrou maior desempenho no impedimento do estabelecimento do edema, notado pelos valores menores que os dos outros grupos, principalmente até T7 (12 horas). Em T6 (seis horas), este tratamento se mostrou ainda mais eficaz, visto que neste momento foi registrado o menor valor de espessura da dobra cutânea durante todo o experimento. Diferentemente do ocorrido com o GII, tratado com o ar-turmerone, o isocurcumenol provavelmente possui ação inibidora da formação de edema superior, associada a potencial efeito preservativo sobre a vasculatura.

As ocorrências de áreas de coloração violácea em torno do ponto de inoculação do veneno de *B. jararaca* surgiram rápida e intensamente, tendo sido notadas em todos os animais (Fig. 5). Essas ocorrências são de extremamente freqüentes nos envenenamentos botrópicos (Villarreal et al., 1978/79; Viana, 1983; Trebien & Calixto, 1989; Abel, 1990; Lomonte et al., 1990; Pérez et al., 1998; Takahira, 1999; Santos, 2002; Silva Junior, 2003).

A observação feita nos animais do grupo que recebeu o soro antibotrópico confirma a capacidade do imunoterápico em reverter os danos sobre a hemostasia e, principalmente sobre a vasculatura. A eficiência do soro é reconhecida e é responsável pela manutenção da vida dos animais e pessoas que sofrem picadas de serpentes (Kamiguti et al., 1986; Kamiguti et al., 1991) além de reverter rapidamente a ação vasculotóxica das metaloproteinases (Gutiérrez et al., 2005).

As hemorragias decorrentes da intoxicação pelo veneno botrópico se deve ao dano à vasculatura causado pelas hemorraginas, que são metaloproteinases que degradam o colágeno da lâmina basal, imputando-se às metaloproteinases maior responsabilidade pelas hemorragias nos acidentes botrópicos. A toxina botrópica ainda possui outras frações com atividades biológicas variadas que se somam e potencializam as hemorragias. Entre elas estão frações procoagulantes, que por sua vez acarreta o consumo de fibrinogênio, incoagulabilidade sanguínea e trombocitopenia (Kamiguti et al., 1991; Kamiguti et al., 1992).

A maior persistência dos halos presentes em GII (ar-turmerone) podem se dever a ineficiência desta fração de *C. longa* em reverter às ações de metaloproteinases que atuam diretamente sobre os vasos degradando o colágeno da matriz basal dos mesmos. Assim sendo o extravasamento de sangue resultaria em formação de halos maiores e mais persistentes. Tal fato pode ser corroborado pela ocorrência de edema neste grupo em intensidade semelhante.

Os halos hemorrágicos apresentados pelos animais dos grupos que receberam além dos tratamentos tópicos o soro antibotrópico (GIV e GV) se mostraram maiores (com diferença estatística significativa). Até 4h não houve diferença entre os grupos, depois ocorreu uma diferença entre 6 e 30h, nos grupos tratados com as frações. Isso pode ser justificado pela interferência causada por esta associação na eficiência do soro em evitar as lesões vasculares e danos potencializando as ações da toxina. Possivelmente os princípios ativos obtidos da *C. longa* formem complexos com o soro antibotrópico reduzindo a biodisponibilidade do imunoterápico.

A ulceração dérmica é uma conseqüência do envenenamento botrópico que pode deixar seqüelas, limitando as atividades dos animais (Rosenfeld e Langlada, 1964;

Rosenfeld et al., 1975). Esta complicação ocorre no local da picada em aproximadamente 10% dos acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* (Rosenfeld e Langlada, 1965; Rosenfeld, 1971; Bauab, 1994).

O grupo que apresentou a alteração mais precoce foi aquele que recebeu o tratamento tópico com vaselina (GI).

Mais uma vez a interferência da associação entre os dois tratamentos tópicos e o imunoterápico se faz notada ao se observar que os animais dos GIV e GV apresentaram ulcerações até duas vezes maiores que as observadas em GII e GIII, sendo esta diferença mais intensa em T8 (24 horas). Os grupos tratados com ar-turmerone e isocurcumenol mostraram as menores médias computadas durante o período experimental, corroborando com os resultados obtidos por Santos et al. (2003a) utilizando extrato de *C. longa* em cães e Melo et al. (2004) que utilizou o ar-turmerone em coelhos, embora nenhum dos dois relatos citados tenha neutralizado o surgimento das ulcerações dérmicas.

Ao compararmos os animais pertencentes aos grupos que receberam os princípios ativos da *C. longa* com aqueles que tiveram o soro antibotrópico associados ao tratamento tópico, nota-se que a ulceração dérmica nestes últimos é mais exuberante, principalmente a partir de T7 (12 horas). Os grupos que receberam os tratamentos associado entre soro antibotrópico e isocurcumenol se mostraram estatisticamente maiores em T12 e T16. Os animais de GI (controle) apresentaram estas lesões até a última observação. O grupo que recebeu o soro antibotrópico (GVI) apresentou a menor persistência, não sendo mais observadas as lesões após T20 (nove dias). Como ocorrido na dormação dos halos, possivelmente tenha ocorrido a diminuição da disponibilidade do soro antibotrópico em decorrência da formação

de complexos. Além do mais, é importante destacar que a lesão vascular é determinante na formação das úlceras dérmicas. Portanto, pode-se correlacionar a ocorrência dos halos hemorrágicos e das ulcerações dérmicas.

Os coelhos pertencentes ao GVI (soro antibotrópico) apresentaram grandes áreas de ulceração dérmica em T6, corroborando com Gutiérrez e Lomonte (1989), Chacur et al. (2000), Wen (2000), Picolo et al. (2002) e Silva Junior (2003). A ineficiência em reverter as alterações locais se deve ao caráter multifatorial do envenenamento botrópico, que não é revertido pelo uso do soro. O tratamento desta intoxicação deve primar pela utilização de vários recursos na tentativa de impedir que seus múltiplos efeitos determinem a ocorrência de necroses e conseqüentes perdas de membros e inviabilidade econômica de animais.

6.2. Hemostasia

Os componentes hemostáticos, constituídos pela parede dos vasos, plaquetas e fatores de coagulação, sofrem diretamente a ação de constituintes do veneno botrópico. Desta forma a função exercida por cada um fica comprometida resultando na redução da eficiência do processo hemostático (Kamiguti et al., 1996; Oliveira et al., 2003; Laing e Moura-da-Silva, 2005; White, 2005). A pequena dose de veneno inoculada foi suficiente para causar alterações sobre a hemostasia e conseqüentemente sobre o tempo de coagulação. Sano-Martins et al. (1994) propuseram o uso do tempo de coagulação como indicador do grau de envenenamento botrópico sistêmico.

Os animais tratados com isocurcumenol (GIII e GV) demonstraram um aumento no tempo de sangramento, notado no fato de que o estancamento do sangramento no local puncionado para a coleta se fazia muito lentamente, requerendo um tempo maior de compressão na região para controle da perda de sangue. Entretanto os menores valores

médios de tempo de coagulação ocorreram nestes grupos. O tempo de coagulação não leva em conta os aspectos relacionados à integridade vascular e aqueles que dizem respeito ao estabelecimento do tampão hemostático e a sua agregação à parede dos vasos. Devido a estas diferenças foi possível fazer esta observação clínica. Este achado pode indicar uma possível ação antiinflamatória, visto que a atividade anticoagulante decorre da influência sobre o TXA₂ e PGI₂, diminuindo as concentrações de ambas, interferindo diretamente sobre a casacata de coagulação.

A redução observada no tempo de coagulação nos primeiros tempos de coletas se deve à ação coagulante do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, apesar do sinal clínico observado ser de um animal que apresenta muitas hemorragias, sinalizando a incapacidade de coagulação sanguínea. As hemorragias ocorrem em função do consumo de fatores de coagulação, entre eles a depleção de fibrinogênio devido à ação de frações similares à trombina, frações ativadoras da protrombina e frações ativadoras do fator X, além de fibrinólise e fibrinogênólise resultante da ação de proteases (Rosenfeld et al., 1959; Kaiser e Michl, 1971; Sano-Martins, 1990; Kamiguti et al., 1991; França e Fan, 1992; Sano-Martins et al., 1995; Roodt et al., 1996; Laing e Moura-da-Silva, 2005). O consumo de fibrinogênio pode ocasionar hemorragias sistêmicas, ou não, dependendo da extensão das lesões no endotélio dos vasos. A presença de hemorragias no veneno, capazes de lesar as células endoteliais, combinadas com a incoagulabilidade do sangue agravam o estado do paciente (Kouyoumdjian, 1990). A incoagulabilidade sanguínea, que ocorre mais frequentemente quando o acidente é causado por serpentes jovens, é atribuída ao consumo de fibrinogênio produzido pelas frações “*thrombin-like*”. Além disso, alguns venenos podem ativar os fatores X e II, acarretando a

formação intravascular de trombina (Sano-Martins, 1990).

Os achados de Koscinczuk et al. (1995), cujos cães apresentaram transtornos da coagulação aos 30 minutos posteriores a inoculação do veneno, corroboram com os achados deste experimento já que os sinais de hemorragias surgiram na realização dos primeiros exames clínicos (15 e 30 minutos), sendo confirmados na avaliação da hemostasia que se deu seis horas após a inoculação do veneno.

Não houve diferença estatística entre os grupos até T6 (21 dias), quando o grupo dois (ar-turmerone) apresentou a menor média e em T7 as maiores médias foram observadas em GI e GIV. Este aumento ocorrido em GIV pode ser justificado pelo valor muito aumentado obtido em um animal deste grupo.

A avaliação do tempo de protrombina, que avalia a via extrínseca da cascata da coagulação revelou que todos os valores médios obtidos permaneceram dentro dos parâmetros de referência, exceção feita ao T5 (14 dias) do GII. Os resultados diferem dos obtidos por Santos (2002) em cães. Estes animais apresentaram aumentos significativos do tempo de protrombina entre duas e 30 horas após a inoculação do veneno de *B. alternatus*. O GIV teve um desempenho superior na redução do tempo de protrombina, apresentando o menor tempo de protrombina médio, além de apresentar médias significativamente menores que os demais grupos em T1 e T4. Este grupo recebeu, em associação com o ar-turmerone, o soro antibotrópico, que por sua vez, possui uma ação superior sobre a cascata de coagulação (Silva Junior, 2002). Todas as médias de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) após a inoculação do veneno botrópico se mostraram acima dos valores de referência estabelecidos para os animais deste experimento ($9,33 \pm 1,85$ segundos).

No grupo II (ar-turmerone) os maiores tempos de TTPa se deram em T5 e T6 (14 e 21 dias). Diminuições do TTPa ocorreram no grupo III (isocurcumenol) nos tempos 5, 6 e 7 (14, 21 e 30 dias) quando comparados com o T1 (seis horas) e no grupo V nos tempos 6 e 7 (21 e 30 dias) quando comparados com os tempos anteriores. O maior valor de TTPa ($P < 0,05$) foi observado no grupo V, uma hora após a inoculação do veneno botrópico.

Todos os valores obtidos para TTPa se encontraram aumentados em relação ao valor de referência principalmente os observados em GI, cujos animais apenas receberam o veneno botrópico. Este aumento generalizado provavelmente se deve à lesão causada sobre a vasculatura, visto que o TTPa avalia a via intrínseca da cascata de coagulação, ou seja, aquela que envolve os fatores teciduais. Isto indica que os tratamentos testados não foram eficientes em reverter a lesão dos vasos, determinando alterações na cascata de coagulação. O mesmo aumento foi observado por Santos (2002) em cães envenenados com *B. alternatus*, Kamiguti et al. (1986) em humanos picados por *B. jararaca* e Sano-Martins et al. (1995) em cães envenenados experimentalmente por *B. jararaca*.

Os animais que demonstraram menores aumentos de tempo de tromboplastina parcial ativada foram aqueles tratados com o ar-turmerone e a sua associação com o soro antibotrópico. Não houve aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada que possa justificar o aumento do tempo de sangramento após a coleta nestes animais (observação clínica), já que este parâmetro avalia fatores teciduais que desempenham importante papel na coagulação.

Os valores aumentados tanto de TP quanto de TTPa se devem à ativação de fatores de coagulação, primordialmente o fator X e protrombina, formação de trombina

endógena e conseqüente consumo de fibrinogênio (Markland 1998). Assim como o TC, estes marcadores da hemostasia são boas opções para a avaliação do envenenamento e do correto estabelecimento do tratamento (Kamiguti et al., 1986; Maruyama et al., 1990, Sano-Martins et al., 1995).

A contagem total de plaquetas se mostrou acima dos parâmetros de referência ($279,96 \pm 124,92$) em GI no T1, GIV no T2 e T7, GV no T2, T5 e T6, e em GVI em T1, T2, T3 e T4, com exceção de GIII no T4 e de G4 em T7.

O aumento nas contagens de plaquetas provavelmente decorre da maior mobilização de reservas orgânicas e ativação plaquetária, associada à ação do soro que impediu o extravasamento de sangue dos vasos e desta forma preservando as plaquetas.

A trombocitopenia e as disfunções plaquetárias foram citadas como efeitos do envenenamento botrópico. As lesões vasculares associadas à ação inicialmente coagulante dos venenos botrópicos são responsáveis pela depleção plaquetária. Esta diminuição é de rápida instalação. O coágulo formado precisa ser desfeito para que a circulação sanguínea se reestabeleça. O mecanismo fibrinolítico é exercido pela plasmina. Pela ação das enzimas semelhantes à trombina presentes no veneno botrópico, forma-se um coágulo débil, que ativa, mesmo assim, a hemostasia terciária (fibrinolítica). As plaquetas ativadas na hemostasia primária secretam de seus grânulos diversas substâncias, entre elas o ADP, sendo responsável, entre outros fatores, pela adesão plaquetária. Entretanto, o veneno também atua sobre a superfície das plaquetas, alterando os receptores que farão as interações entre plaquetas e endotélio lesado, impedindo uma interação adequada destes componentes estruturais (Kamiguti et al., 1991; Kamiguti, 1992; Sano-Martins et

al., 1995; Kamiguti et al., 1996; Sano-Martins et al., 1997; Castro et al., 1998; Takahira, 1999). A trombocitopenia também foi observada por Franceschi (1990) em cães que sofreram envenenamento experimental por *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*. Humanos picados por *Bothrops jararaca* demonstraram o mesmo quadro de diminuição dos níveis de plaquetas (Kamiguti et al., 1991; Sano-Martins et al., 1997).

6.3. Bioquímica sérica

Os resultados obtidos na avaliação da uréia e creatinina estiveram dentro dos valores de referência traçados para este experimento ($48,36 \pm 13,87 \text{ mg/dl}$ e $1,11 \pm 0,20 \text{ mg/dl}$ respectivamente). Assim sendo, não existem indícios bioquímicos de lesões renais. Os animais que foram sacrificados em cada grupo também não apresentaram lesões diagnosticadas à microscopia, corroborando com os achados bioquímicos. O surgimento de alterações renais (uremia) decorrentes do envenenamento botrópico em humanos variam entre 18 horas a cinco dias (Amaral et al., 1986). Barraviera e Pereira (1994) afirmam que esta alteração é rara nos acidentes ofídicos.

Estes achados podem se justificar pela dose de veneno inoculada, insuficiente para causar alguma lesão renal, diferentemente do constatado por outros pesquisadores (Amaral et al., 1985, Amaral et al., 1986; Havt et al., 2001). Ressalta-se também o fato de existirem variações de composição dos venenos ofídicos em função de idade, sexo, época do ano e regime alimentar (Rosenfeld et al., 1959; Kamiguti e Hanada, 1985; Kouyoumdjian e Polizelli, 1989; Maruyama et al., 1990; Ferreira et al., 1992; Furtado et al., 2006). A via de administração também pode influenciar na resposta clínica dos animais. Carneiro (2005) trabalhando com cães e frações do veneno de *B. jararacussu* inoculadas na próstata também verificou a inexistência de variações nestes parâmetros.

A avaliação das transaminases é a forma rotineira de avaliar a função hepática. O aumento sérico de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) indicam a injúria hepatocelular e esse aumento está relacionado com a intensidade e a duração deste processo. O aumento de AST também pode decorrer de lesões em outros tecidos como os músculos, rins, pâncreas, eritrócitos e danos celulares em geral (Tennant, 1997).

O acidente botrópico causou aumento de ALT em cães 12 horas após a inoculação do veneno (Takahira, 1999), assim como em eqüinos utilizados para a produção do soro antibotrópico (Angulo et al., 1997). Também são relatados aumentos de AST em casos de envenenamento tanto na medicina humana quanto na veterinária (Chaves et al., 1992; Takahira, 1996; Takahira, 1999; Nuñez et al., 2004). Inicialmente esse aumento não é atribuído às lesões hepáticas, mas em decorrência da destruição tecidual característica do acidente botrópico. Entretanto, os valores de AST observados nos grupos tratados com o isocurcumenol mostram um aumento que pode indicar uma potencial ação hepatotóxica desta substância, o que foi confirmado pela histopatologia, apesar do fato de que os animais sacrificados para este exame só ter recebido os tratamentos por 48 horas.

Os aumentos dos níveis plasmáticos de CK corroboram com os achados de Barraviera (1993), Takahira (1996), Takahira, (1999), Otero et al. (2002), Chávez et al (2003) e Oliveira (2005). Este aumento de CK se deve à ação de fosfolipase, proteases, metaloproteinases que causam lesão da musculatura (Zingali et al., 1988).

No presente trabalho, a ausência deste aumento observada em alguns animais pode ser atribuída à dose e volume de veneno inoculado, além da inoculação intradérmica, tendo sido incapazes de ocasionar lesões de

camadas mais profundas, entre elas as musculares.

O aumento de CK coincide em quase todos os tempos com o aumento de AST, que também pode indicar lesão muscular em GII (ar-turmerone) e GIII (isocurcumenol), acontecendo o mesmo no grupo cinco (isocurcumenol e soro antibotrópico) nos tempos três e quatro e o grupo dois (ar-turmerone) em T6. Desta forma o aumento de AST não pode ser consequência apenas de lesões hepáticas. Tal achado foi obtido por Takahira (1996) em seu estudo com cães e por Barraviera (1993) em humanos.

6.4. Hematologia

O resultado obtido para contagem de hemácias e hematócrito não corroboram com os resultados obtidos por Takahira (1999) e Carneiro (2005) que não observaram diminuições significativas da contagem de hemácias e de hematócrito. Alguns pesquisadores citaram a ocorrência de hemólise *in vitro* (Kelen et al., 1960 e Rosenfeld, 1960/62) e *in vivo* (Sano-Martins, 1995; Soerensen, 1995, Santos, 2002), podendo justificar a diminuição da contagem de hemácias, sendo a possível causa a interferência que o veneno causaria nas membranas eritrocitárias diminuindo a sua resistência (Chaves et al., 1992). A diminuição nas contagens de hemácias, concentração de hemoglobina e volume globular foi observada 36 horas após a inoculação do veneno de *B. jararaca* e *B. neuwiedi* em cães, sendo este achado atribuído às freqüentes coletas de sangue.

Na primeira coleta dos animais do GI mostrou a menor das médias entre todos os grupos neste tempo, fato que pode ser explicado pela ausência de qualquer tratamento, além de serem animais de menor peso em relação ao peso que iam adquirindo como passar do mês de experimento. A dor também pode ter causado uma diminuição da ingestão de alimentos, acarretando uma

menor hematopoiese, já relatada por Oliveira em bovinos (2005).

Sano-Martins et al. (1995) trabalhando com cães que receberam veneno de *B. jararaca* (0,1mg/kg, I.V.) não observaram a diminuição significativa de hemácias. Diferentemente de Oliveira (2005) que observou aumento nas contagens de eritrócitos 24 horas após a inoculação intramuscular do veneno de *B. alternatus*, justificada possivelmente pela contração esplênica resultante da intensa dor local. Após esta coleta os animais demonstraram-se anêmicos. A mesma anemia observada em humanos por Barraviera (1993) e em eqüinos utilizados para a produção de soro antiofídico por Angulo et al. (1995).

Os valores médios dos índices hematimétricos não se mantiveram dentro dos valores normais, resultado diferente do obtido por Santos (2002) trabalhando com cães tratados com *C. longa* e Takahira (1999) que inoculou veneno de *B. alternatus* e *B. moojeni* em cães. Uma possível causa desta alteração é a hemólise intravascular decorrente da fragilidade da membrana eritrocitária. A obtenção de amostras apresentando graus variados de hemólise corrobora com este achado. A ocorrência de amostras hemolisadas obtidas de cães foi relatada por Silva Junior (2003). Santos e colaboradores (2003) citam a ocorrência de macrocitose em cães em fase de recuperação após hemorragias severas, lembrando que estes aumentos de VGM eram transitórios.

As leucocitoses significativas observadas nos tempos seis e sete do GII e nos tempos dois e três do GIII podem indicar a ação de frações semelhantes à curcumina, constituinte da *C. longa*, estimulador do sistema imune (South et al, 1997). Santos (2002) utilizou extrato de *C. longa* em cães intoxicados com veneno de *B. alternatus* e observou leucocitose mais pronunciada nos grupos tratados com a planta. Tais fatos indicam potencial ação antiinflamatória da *C.*

longa e seus constituintes. O uso de anti-inflamatórios não esteroides mostrou redução da migração leucocitária *in vivo* e *in vitro* (Srimal e Dhawan, 1972; Dow et al., 1990; MacAllister, 1994).

No presente experimento, de forma geral, não ocorreu neutrofilia diferentemente do que ocorreu com os cães intoxicados com o veneno de *B. alternatus* e *B. moojeni*, causando um processo inflamatório local resultando numa leucocitose neutrofílica (Takahira, 1999). Entretanto, observou-se em T3 (cinco dias) no GIII um aumento significativo nas contagens de neutrófilos. Tal achado sugere ação anti-inflamatória do isocurcumenol.

A ação do veneno sobre o organismo animal induz uma resposta inflamatória de fase aguda com liberação de catecolaminas, mediadores celulares e humorais, e fatores quimiotáticos séricos, responsáveis pelo acúmulo de neutrófilos (Bogliolo, 1978; Barraviera et al., 1995; Farsky et al., 1997; Pérez et al., 1998; Farsky et al., 2000). A ausência de neutrofilia indica a ocorrência de um processo inflamatório discreto ou uma invasão pouco significativa do parênquima (Jain, 1993). A dose de veneno inoculada e a via escolhida possivelmente interferiram na obtenção deste resultado, já que a dose escolhida não causou grandes alterações sistêmicas e a via intradérmica visou causar a lesão restrita ao local que recebeu a inoculação.

Os eosinófilos permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie, apresentando diferença estatisticamente significativa apenas em T2. Este resultado difere do citado na literatura, já que a *C. longa* é conhecida como imunomoduladora, estimulando a eosinofilia, semelhante ao que ocorre com o *Kalanchoe brasiliensis* (Ibrahim et al., 2002). Santos (2002) obteve eosinopenia no grupo de cães tratados com extrato aquoso de *C. longa* a 10%.

Ocorreu uma linfocitose em GI nos tempos dois e quatro e em linfocitopenia em GIII no tempo três, reforçando a possibilidade da real ação anti-inflamatória do isocurcumenol. Santos (2002) obteve resultado semelhante em cães, com uma pequena redução nas contagens de linfócitos, sem ultrapassar os limites fisiológicos para a espécie. O mesmo ocorreu com Carneiro (2005), diferentemente do que constatou Oliveira (2005), que obteve linfocitose em bovinos intoxicados com veneno de *B. alternatus*, visto que esta ocorrência é fisiológica nesta espécie. Angulo *et al.* (1997) observaram linfocitose em equinos destinados à produção de soro antiofídico, fato justificado pela inoculação de doses de veneno acrescidas de adjuvante que deveria favorecer a resposta imune.

Tanto os basófilos quanto os monócitos permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie. A monocitose ocorreu em cães nos experimentos de Sano-Martins e colaboradores (1995), Takahira (1999), Santos (2002) e Silva Junior (2003). Oliveira (2005) não observou monocitose em bovinos.

6.5. Achados de necropsia

Durante a realização da necropsia não foram observadas lesões macroscópicas no coração, rins, cavidade torácica. Em todos os grupos os animais apresentavam fígado congesto e pulmões com edema e hemorragias petequiais subfocais discretas. Estas lesões não podem ser atribuídas exclusivamente ao veneno de *B. jararaca*, já que o sacrifício pode ser responsável por estas alterações.

Todos os animais apresentaram lesões puntiformes circundadas por halos hemorrágicos nos locais que receberam a inoculação do veneno botrópico. Também ocorreram áreas de hemorragias petequiais a sufusões, semelhantes às obtidas em bovinos por Oliveira (2005).

6.6. Histopatologia

Não foram observadas alterações nos diversos órgãos coletados para exame, com exceção do fígado e da pele.

As lesões hepáticas se limitaram às degenerações por glicogênio intensas e difusas em todos os animais. Oliveira (2005) diagnosticou áreas de infiltrado periportal discreto e degeneração centrolobular discreta nos dois animais que morreram após a inoculação do veneno de *B. alternatus* no membro posterior esquerdo. Diferentemente dos achados de Takahira (1999) que encontrou degeneração hidrópica e esteatose hepática em cães e Valença (1999) que observou edemas das veias centrolobulares, além de desorganização do parênquima hepático e intensa congestão portal. Ressalta-se que estas lesões podem ser causadas pelo sacrifício dos animais, não podendo ser atribuídas exclusivamente à ação do veneno botrópico.

As peles dos animais apresentaram lesões devido à inoculação do veneno com variações decorrentes das ações dos tratamentos testados. Os coelhos pertencentes ao GI e GII apresentaram epidermite e dermatite necrótica granulocítica aguda e extensa e degeneração fibrinóide da parede vascular, sendo que estas alterações se mostraram mais intensas em GI. Nos Grupos III, IV e V, as lesões se caracterizaram por presença de infiltrado granulocítico e hemorragia na derme profunda além de ulceração dérmica fibrinóide de alguns vasos de menor calibre e vênulas.

Em GVI notou-se extensa ulceração dérmica da derme superficial e profunda, área focal de dermite e dermatite necrótica, infiltrado granulocítico intenso, perda de anexos da pele e de colágeno e degeneração fibrinóide da parede vascular. Este processo se mostrou mais intenso que o observado no grupo que

recebeu apenas o veneno botrópico. Segundo Rosenfeld (1979) o emprego da soroterapia adequada, feita em um período de três horas após uma picada de *Bothrops* evita a ulceração dérmica e salva a vida do paciente. Neste tipo de acidente uma soroterapia instituída 24 a 48 horas depois preserva a vida do doente, porém não evita a ulceração dérmica. Villarroel et al., em trabalho realizado em 1978/79, verificaram que a capacidade neutralizadora do soro específico contra o veneno de *Bothrops jararaca* só é plenamente eficaz quando administrado por via endovenosa e imediatamente após o acidente. Estudo realizado por Viana (1983) indicou que a aplicação do soro por via intramuscular, mesmo em dose suficiente para neutralizar a ação do veneno, não assegura a efetividade do tratamento.

Com a imediata aplicação do soro, a reversão dos efeitos sistêmicos é bem sucedida, embora a neutralização dos efeitos locais seja mais complicada, podendo originar seqüelas permanentes (Gutierrez & Lomonte, 1989). Um importante fator para a prevenção da ulceração dérmica local é o tempo que decorre desde a picada até o início do tratamento com o antiveneno (Villarroel et al., 1978/79; Viana, 1983).

A avaliação dos quadros locais de 130 pacientes envolvidos em acidentes botrópicos realizada por Wen (2000), indicou que o uso do soro de 3 a 4 horas após a picada não se mostrou eficaz na reversão do quadro local, diferentemente da boa ação notada nos parâmetros sistêmicos. Esta ineficácia não se explica pela dose insuficiente de soro, já que em todos os casos o soro foi adequadamente fornecido. Portanto o soro não neutraliza adequadamente as reações locais, mioulceração dérmica, e ulceração dérmica induzida pelo veneno mesmo quando administrado imediatamente após o acidente. Segundo Chacur et al. (2000) a ineficácia em reverter à sintomatologia local do

veneno botrópico não se deve a ausência de anticorpos específicos, mas à rápida liberação de mediadores químicos responsáveis pela hiperalgesia e edema. Santos (2002) relatou ulceração dérmica nos pontos de inoculação nos quatro animais que foram tratados com soro antibotrópico e, principalmente, nos quatro animais tratados com Flunixin Meglumina. Dos quatro animais tratados com extrato aquoso de *C. longa* 10%, apenas dois apresentaram ulceração dérmica.

7. CONCLUSÕES

O veneno de *Bothrops jararaca* na dose de 0,04mg/kg por via intradérmica foi suficiente para causar úlcera dérmica em coelhos.

O aumento da espessura de pele foi observado mais tardiamente, a partir de 24 horas, nos animais pertencentes aos grupos tratados com as frações, ar-turmerone e isocurcumenol, associadas ao soro antibotrópico.

Os maiores graus de necrose ocorreram no grupo tratado com o isocurcumenol e soro antibotrópico, enquanto o menor foi no grupo tratado com ar-turmerone.

O grupo de animais tratados com ar-turmerone apresentou menores valores nos tempos de coagulação e de protrombina.

Os animais tratados com as frações, ar-turmerone e isocurcumenol, apresentaram aumento em AST, ALT e CK.

Os animais tratados com as frações apresentaram leucocitose sem neutrofilia.

Não foram evidenciadas alterações histopatológicas comprovadamente relacionadas ao envenenamento botrópico nos rins, pulmão, coração e baço.

O exame histopatológico da pele demonstrou dermatite necrótica granulocítica aguda e extensa, além da degeneração fibrinóide da parede vascular, na região da inoculação do veneno.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA DE PÉREZ, O.; BREM, J.J. Secuelas de ofidismo em un equino de trabajo. *Vet. Arg.*, v.14, n.137, p.474-478, 1997.

ACOSTA DE PÉREZ, O.; TEIBLER, P.; LEIVA, L.; RÍOS, E.; NEGRETTE, M.S.; POLLITT, C. Equine laminitis: bites by *Bothrops spp.* cause hoof lamellar pathology in the contralateral as well as in the bitten limb. *Toxicon*, v.48, n.3, p.307-312, 2006.

ALVES, A.L.; GIMENEZ, A.R.M.; VENTURA, D.V.R. et al. *Cartilha de ofidismo (COBRAL)*. Brasília: Ministério da Saúde, 1989, 32p.

ALVES, L.V.; TEMPORAL, R.M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L.L. Efficacy of a diarylheptanoid derivative against *Leishmania amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98, n.4, p.553-555, 2003.

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; SILVA, O.A.; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHÃES, R.A.; REIS, R.J.; CARNEIRO, J.G.; CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos, botrópico e crotálico. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.28, n.4, p.220-227, 1986.

AMARAL, C.F.S.; SILVA, O.A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. *Toxicon*, v.23, n.6, p.877-885, 1985.

- AMMON, H.P.T.; WAHL, M.A. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.*, v.57, p.1-7, 1991.
- ANGULO, Y.; ESRADA, R.; GUTIÉRREZ, J.M. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (*Crotalinae*) antivenom. *Toxicon*, v.35, n.1, p.81-90, 1997.
- ARATANEHEMUGE, Y.; KOMIYA, T.; MOTTEKI, H.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; HIBASAMI, H. Selective induction of apoptosis by ar-turmerone isolated from tumeric (*Curcuma longa* L) in two human leukemia cell lines, but not in human stomach cancer cell line. *Int. J. Mol. Med.*, v.9, p.481-484, 2002.
- ARAÚJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, n.5, p.723-728, 2001.
- ARAUJO, P.; BELLUOMINI, H.E. Toxicidade de venenos ofídicos, I-Sensibilidade específica de animais domésticos e de laboratório. *Mem. Inst. Butantan*, v.30, p. 133-142; 1960.
- ARAÚJO, P.; ROSENFELD, G.; BELLUOMINI, H.E. Toxicidade de venenos ofídicos. II. Doses mortais para bovinos. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, v.30, p.49-56, 1963.
- ARRUDA, V.A.; GUIMARÃES, A.Q.; HYSLOP, S.; ARAÚJO, P.M.F.; BOM, C.; ARAÚJO, A.L. Bothrops lanceolatus (Fer de lance) venom stimulates leucocyte migration into the peritoneal cavity of mice. *Toxicon*, v.41, p.99-107, 2003.
- BARBOSA, P.S.F.; HAVT, A.; FACÓ, P.E.G.; SOUSA, T.M.; BEZERRA, I.S.A.M.; FONTELES, M.C.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MONTEIRO, H.S.A. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon*, v.40, p.1427-1435, 2002.
- BARRAVIERA, B. *Alterações hepáticas no envenenamento ofídico*. 1993. 154f. Tese (Livre-Docência), Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade estadual Paulista.
- BARRAVIEIRA, B.; PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes do gênero bothrops. In: *Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos*. Petrópolis: EPUB, 1999. Cap.20, p.261-280.
- BAUAB F.A. Clinical and epidemiological aspects of the “urutu” lance headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian Hospital. *Trop. Med. Parasitol.*, v.45, p.243-245, 1994.
- BIEBER, A.L. Metal and non-protein constituents in snakes venoms. In: LEE, C.Y. (ED.) *Snake venoms, Handbook of experimental pharmacology 52*, Berlin: Springer, 1979, p.684-750.
- BOCHNER, R.; STRUCHNER, C.J. Aspectos ambientais e sócio-econômicos relacionados à incidência de acidentes ofídicos no estado do Rio de Janeiro de 1990 a 19996: uma análise exploratória. *Cad. Saúde Pública* n.20, v.4, p.976-985, 2004.
- BOCHNER, R.; STRUCHNER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos: uma revisão. *Cad. Saúde Pública*, v.19, n.1, p. 7-16, 2003.
- BOER-LIMA, P.A.; GONTIJO, J.A.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.61, n.5, p.698-706, 1999.
- BOER-LIMA, P.A.; GONTIJO, J.A.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli

- changes in rat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.67, n.2, p.217-222, 2002.
- BOGLIOLO, L. *Patologia geral básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 713p.
- BORGES, R.C. *Serpentes peçonhentas brasileiras: manual de identificação, prevenção e procedimentos em caso de acidentes*. São Paulo: Atheneu, 1999. p.146.
- BORGES, R.C.; ARAÚJO, A.F.B. Seleção De habitat em duas espécies de jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge e *B. neuwiedi* Wagler) (Serpentes, Viperidae). *Rev. Bras. Biol.*, v.4, n58, p.591-601, 1998.
- BRAGA, M.E.M.; LEAL, P.F.; CARVALHO, J.E.; MEIRELES, M.A.M. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of tumeric (*Curcuma longa* L) extracts obtained using various techniques. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.6604-6611, 2003.
- BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of brazilian medicinal plant research. *J. ethnopharmacol.*, v.39, p.53-67, 1993.
- CALIL-ELIAS, S.; THATTASSERY,E.; MARTINEZ, A.M.B.; MELO, P.A. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.35, n.10, p.1233-1235, 2002.
- CALMETTE, A. Propriétés du sérum des animaux immunisés contre le venin des serpentes, et thérapeutique de l'envenimation. *C. R. Acad. Sci.*, v.118, p.720-722, 1894.
- CARDINET III, G.H. Skeletal Muscle function. In : KANEKO, J.J. ; HARVEY, J.W. ; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press : San Diego, 1997, p.407-440.
- CARDOSO, J.L.C. Bothropic accidents. *Mem. Inst. Butantan*, n.52, p.43-44, 1990. (SUPLEMENTO)
- CARNEIRO, R.A. *Inoculação intraprostatica do veneno da serpente Bothrops jararacussu e de sua fração miotóxica em cães :avaliação clínica, laboratorial e anatomopatológica*. 2005. 146p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária da UFMG
- CASTRO, H.C.; DUTRA, D.L.S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B. Bothroaltermín, a trombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*, v.36, n.12, p.1903-1912, 1998.
- CHACUR, M.; PICOLO, G. ; GUTIERREZ, J.M. et al. Capacidade do antiveneno botrópico em neutralizar a hiperalgesia induzida pelos venenos de *Bothrops asper*. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 6, 2000. São Pedro. *Anais...*São Pedro: Cruzeiros, 2000, p.270.
- CHACUR, M.; PICOLO, G. ; GUTIERREZ, J.M. ; TEIXEIRA, C.F.P. ; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Toxicon*, v.39, p.1173-1181, 2001.
- CHACUR, M.; PICOLO, G. ; TEIXEIRA, C.F.P. ; CURY, Y. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, v.40, p.1047-1051, 2002.
- CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Botrops asper* (Terciopelo). *Toxicon*, v.30, n.9, p.1099-1109, 1992.
- CHERDCHU, C.; KARLSSON, E. Proteolytic-independent cobra neurotoxin inhibiting activity of *Curcuma* sp.

- (Zingiberaceae). *S. E. Asian J. Trop. Med. Pub. Health*, v.14, p.176-178, 1983.
- CHIPPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*, v.36, n.6, p.823-846, 1998.
- COUTO, S.E.R. Criação e manejo de coelhos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de Laboratório: Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. Cap.12, p.93-103.
- COX, J.C.; MOISIDIS, A.V.; SHEPERD, J.M.; DRANE, D.P.; JONES, S.J. A novel format for a rapid sandwich EIA and its application to the identification of snake venoms. *J. Immunol. Methods*, v.146, p.213-218, 1992.
- DETERS, M.; SIEGERS, C.; HÄNSEL, W.; SCHNEIDER, K.; HENNIGHAUSEN, G. Influence of curcumin on cyclosporine-induced reduction of biliary bilirubin and cholesterol excretion and on biliary excretion of cyclosporine and its metabolites. *Planta Med.*, v.66, p.429-434, 2000.
- DETERS, M.; KLABUNDE, T.; MEYER, H.; RESCH, K.; KAEVER, V. Effects of curcumin on cyclosporine-induced cholestasis and hypercholesterolemia and on cyclosporine metabolism in the rat. *Planta Med.*, v.69, p.337-343, 2003.
- DETERS, M.; SIEGERS, C.; MUHL, P.; HÄNSEL, W. Choleretic effects of curcuminoids on an acute cyclosporine-induced cholestasis in the rat. *Planta Med.*, v.65, p.610-613, 1999.
- DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; TALAY, P. Relation of structure of curcumin analogues to their potencies as inducers of phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*, v.20, n.5, p.911-914, 1999.
- DOW, S.W.; ROSYCHUK, R.A.W.; McCHESENEY, A.E.; CURTIS, C.R. Effects of flunixin and flunixin plus prednisone on the gastrointestinal tract of dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, n.7, p.1131-1137, 1990.
- FAN, H.W.; MARCOPITO, L.F.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; MALAQUE, C.M.S.; FERRARI, R.A.; THEAKSTONE, R.D.G.; WARRELL, D.A. Sequential randomized and double blind trial of promethazine prophylaxis against early anaphilatic reactions to antivenom for *Bothrops* snake bites. *B.M.J.*, v.318, 1999.
- FARIA, L.; ANTUNES, E.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon*, v.39, p.825-830, 2001.
- FARSKY, S.H.P.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M. et al. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon*, v.35, n.2, p.185-193, 1997.
- FEITOSA, R.F.G.; MELO, I.M.L.A.; MONTEIRO, H.S.A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no estado do Ceará – Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30, n.4, p.295-301, 1997.
- FERREIRA, L.A.F.; HENRIQUES, O.B.; ANDREONI, A.A.S.; VITAL, G.R.F.; CAMPOS, M.M.C.; HABERMEHL, G.G.; MORAES, V.L.G. Antivenom and biological effects of ar-tuemerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Toxicon*, v.30, n.10, p.1211-1218, 1992.
- FERREIRA, M.L.; SILVA, A.M.M.; FRANÇA, F.O.S. et al. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*, v.30, n.12, p.1603-1608, 1992.

- FERREIRA JÚNIOR, R.S.; BARRAVIERA, B. Tissue necrosis after canine bothropic envenoming: case report. *J. Venom Anim. Toxins*, v.7, n.2, p.302-312, 2001.
- FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M. *Patologia clínica veterinária*. Belo Horizonte: Rabelo, 1981. 279p.
- FONSECA, F.V.; MELO, M.M.; SILVA JUNIOR, P.G.P.; DANTAS-BARROS, A.M. Extratos de *Curcuma longa* L e *Kalanchoe brasiliensis* Camb. no tratamento local por *Bothrops alternatus*. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.14, p.22-29, 2004.
- FONTEQUE, J.H.; BARROS FILHO, I.R.; SAKATE, M. Acidentes botrópicos de interesse em animais domésticos. *Rev. Educ. Cont. CRMV-SP*, v.4, n.3, p.102-111, 2001.
- FRANÇA, F.O.S.; FAN, H.W. Acidente botrópico. In: SCHVARTSMAN, S. *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. São Paulo: Sarvier, 1992, p.149-160.
- FRANCESCHI, J.P. Systemic activities of bothropic venoms. *Mem. Inst. Butantan*, n.52, p.41-42, 1990. (SUPLEMENTO)
- FRANCIS, B.; SEEBART, C.; KAISER, I.I. Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal ion chelation. *Toxicon*, v.30, p.1239-1246, 1992.
- FRANCO, R.L. et al. Snakebites in southern Minas Gerais State, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins*, v.7, n.1, p. 70-78, 2001.
- FREITAS, M.A.; GENO P.W.; SUMNER L.W.; COOKE M.E.; HUDIBURG S.A.; OWNBY C.L.; KAISER I.I.; ODELL G.V.. Citrate is a major component of snake venoms. *Toxicon*, v.30, p.461-464, 1992.
- FURTADO, M.F.D.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; ROCHA, M.M.T. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (serpentes: viperidae). *Toxicon*, v.48, n.4, p.401-410, 2006.
- GOTTLIEB, O.R., BORIN, M.R.M.B. Natural products research in Brazil. *J. Braz. As. Advanc. Sc.*, v.49, n.5/6, p.315-320, 1997.
- GUTIÉRREZ, J.M. Clinical toxicology of snake bite in Central America. In: MEIER, J., WHITE, J. (Eds). *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. Boca Raton: CRC Press, 1995, p.645-665.
- GUTIÉRREZ, J.M. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem. Inst. Butantan*, n.52, p.37-38, 1990.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; MATA, E.; CERDAS, L. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) venom. *Toxicon*, v.24, n.3, p.223-231, 1986.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. *Mem. Inst. Butantan*, n.51, p.211-223, 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M.; NUÑEZ, J.; DIAZ, C.; CINTRA, A.O.C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Skeletal muscle degeneration after injection of bothropstoxin II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*, *Exp. Molec. Pathol.*, v.55, p.217-229, 1991.
- GUTIERREZ, J.M.; OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Molec. Pathol.*, v.40, p.367-379, 1984.
- 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.997-1011, 2005
- HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. *Biologia Clínica de Coelhos e Roedores*. São Paulo: Rocca. 1993. 138p.
- HARVEY, A. Testing of natural remedies for natural toxins. *Toxicon*, v.41, p.939, 2003.
- HAVT, A.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF blockers. *Toxicon*, v.39, p.1841-1846, 2001.
- HENEINE, L.G.D. *An immunological study of Brazilian snake venom antigens: towards a species-specific diagnostic assays*. 1995. 208 f. Tese (Doutorado em imunologia) – University of Birmingham.
- HONG, H.C.; NOH, M.S.; LEE, W.Y.; LEE, S.K. Inhibitory effects of natural sesquiterpenoids isolated from the rhizomes of *Curcuma zedoaria* on prostaglandin E2 and nitric oxide production. *Planta Med.*, v.68, p.545-547, 2002.
- HUDELSON, S.; HUDELSON, P. Pathophysiology of snake envenomization and evaluation of treatments – part I. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.17, n.7, p.889-896, 1995a.
- HUDELSON, S.; HUDELSON, P. Pathophysiology of snake envenomization and evaluation of treatments – part III. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.17, n.11, p.1385-1394, 1995b.
- IBRAHIM, T., et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. *Int. immunopharmacol.*, v.2, p.875-883, 2002.
- JACOME, D.O.; MELO, M.M.; SANTOS, M.M.B.; HENEINE, L.G.D. Kinetics of venom and antivenom serum and clinical parameters and treatment efficacy in *Bothrops alternatus* envenomed dogs. *Vet. Human Toxicol.*, v.44, n.6, p.334-338, 2002.
- JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*, (Ed) Philadelphia, Lea & Febiger, 1993, 417p.
- JANEIRO-CINQUINI, T.R.F. Capacidade reprodutiva de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). *Iheringia*, v.94, n.4, p.429-431, 2004.
- JANG, M.K.; SOHN, D.H.; RYU, J. a curcuminoid and sesquiterpenes as inhibitors of macrophage TNF- α release from *Curcuma zedoaria*. *Planta Med.*, v.67, p.550-552, 2001.
- JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Infections in the bite site after envenoming by snakes of the *Bothrops* genus. *J. Venom. Anim.Toxins*, v.3, n.2, 1997.
- KAISER, E., MICHL, H. Chemistry and Pharmacology of the venoms of *Bothrops* and *Lachesis*. In: BUCHERL, W., BACKLEY, E. E. *Venomous animals and their venoms*. London: Academic Press, 1971. v.2, cap.32: p. 307-317.
- KAMIGUTI, A.S.; HANADA, S. Study of the coagulant and proteolytic activities of newborn *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, v.23, p.580, 1985.
- KAMIGUTI, A.S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M; SANO-MARTINS, I.S.; NAHAS, L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, v.19, p.199-204, 1986.
- KAMIGUTI, A.S.; RUGMAN, F.P.; THEAKSTON, R. D. G.; FRANÇA, F.O.S.; ISHII, H.; HAY, C.R.M.; BIASG. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming.

- Thromb. Haemost.*, v.67, n.4, p.484-488, 1992.
- KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. G.; DESMOND, H.; HUTTON, R. A. Systemic Haemorrhage in Rats Induced by Haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, v.29, n.9, p. 1097-1105, 1991.
- KAWAMORI, T.; LUBERT, R.; STEELE, V.E.; KELLOFF, G.J.; KASKEY, R.B.; RAO, C.V.; REDDY, B.S. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res.*, v.59, p.597-601, 1999.
- KELEN, E.M.A., ROSENFELD, G., NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. II. Variation in relation to erythrocyte species. *Mem. Inst. Butantan*, v.30, p.133-142, 1960.
- KIM, K.I.; SHIN, K.S.; JUN, W.J.; HONG, B.S.; SHIN, D.H.; CHO, H.Y.; CHANG, H.I.; YOO, S.M.; YANG, H.C. Effects of polysaccharides from rhizomes of *Curcuma zedoaria* on macrophage functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.65, n.11, p.2369-2377, 2001.
- KOCHOLATY, W.F., BILLINGS, T.A., ASHLEY, B.D. Effects of the route of administration on the neutralizing potency of antivenins. *Toxicon*, v.5, n.3, p.165-170, 1968.
- KOIDE, T.; NOSE, M.; OGIHARA, Y.; YABU, Y.; OHTA, N. Leishmanicidal effect of curcumin *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.*, v.25, n.1, p.131-133, 2002.
- KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R. Studies on the quantitative method for determination on hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jpn. J. M. Sc. Biol.*, v.13, p.43-51, 1960.
- KOSCINCZUK, P.; PÉREZ, O.A.; MAIDANA, H.R. Evolución y tratamiento del accidente ofídico por *Bothrops yarara* en caninos. *Rev. Med. Vet.*, v.76, n.5, p.310-318, 1995.
- KOUYOUMDJIAN, J.A. intracranial haemorrhage after snake bite. *Mem. Inst. Butantan*, v.52, p.45-46, 1990 (Suplemento).
- KOUYOUMDJIAN, J.A.; POLIZELLI, C. Snakes bites by *Bothrops moojeni*: correlation of the clinical picture with the snake size. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.31, n.2, p.84-90, 1989.
- KURODA, M.; MIMAKI, Y.; NISHIYAMA, T.; MAE, T.; KISHIDA, H.; TSUKAGAWA, M.; TAKAHASHI, K.; KAWADA, T. NAKAGAWA, K.; KITAHARA, M. Hypoglycemic effects Of tumeric (*Curcuma longa* L. rhizomes) on genetically diabetic KK-A^y mice. *Biol. Pharm. Bull.*, v.28, n.5, p.937-939, 2005.
- LAING, G.D.; MOURA-DA-SILVA; A.M. Jararagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon*, v.45, p.987-996, 2005.
- LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K.; BRIDGEWATER, E. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.1, n.10, 2001. www.biomedcentral.com/1472-6882/1/10
- LEE, C.J.; LEE, J.H.; SEOK, J.H.; HUR, G.M.; PARK, Y.C.; SEOL, I.C.; KIM, Y.H. Effects of baicalein, berberine, curcumin and hesperidin on mucin release from airway goblet cells. *Planta Med.*, v.69, p.523-526, 2003.
- LEE, R.J.; WHITE, P.O. A clinical study of the coagulation time of blood. *Am. J. Med. Sc.*, v.145, p.495-503, 1913.

- LUPPER, S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part two. *Alt. Med. Rev.*, v.4, n.3, p.178-188, 1999.
- MacALLISTER, G.G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Their mechanism of action and clinical uses in horses. *Vet. Med.*, p.237-240, 1994.
- MAHAKUNAKORN, P. et al. Cytoprotective and cytotoxic effects of curcumin: dual action on H₂O₂ – induced oxidative cell damage in NG108-15 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, v.26, n.5, p.725-728, 2003.
- MALLEY, A.D. The pet rabbit in companion animal practice. *Ir. Vet. J.*, v.49, n.2, p.112-114, 1996.
- MANDELBAUM, F. R. Snake venom hemorrhagins. *Mem. Inst. Butantan*, v.52, p.35-36, 1990 (Suplemento).
- MARIA, W.S. *Avaliação e correlação de ensaios in vitro e in vivo de antivenenos botrópicos*. 1998. 100f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, 1998.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the haemostatic system. *Toxicon*, v.36, n.12, p.1749-1800, 1998.
- MARTINS, A.P.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M.J.; PROENÇA DA CUNHA, A.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S.; MAZZONI, V.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Essential oil composition and antimicrobial activity of three Zingiberaceae from S. Tomé e Príncipe. *Planta Med.*, v.67, p.580-584, 2001.
- MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C.; SANO-MARTINS, I.S.; CHUDZINSKI, A.M.; SANTORO, M.L. MORENA, P. TOMY, S.C.; ANTONIO, L.C. MIHARA, H, KELEN, E.M.A. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca) *Tromb Haemost.*, v.63, p.449-453, 1990.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C. et.al. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier: São Paulo, 2003, cap.4, p.33-61.
- MELO, M.M.; HABERMEHL, G.G.; OLIVEIRA, N.J.F.; NASCIMENTO, E.F.N.; SANTOS, M.M.B.; LÚCIA, M. Treatment of *Bothrops alternatus* envenomation by *Curcuma longa* and *Calendula officinalis* extracts and ar-turmerone. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootc.*, v.57, n.1, p.7-17, 2004.
- MELO, M.M.; SILVA JUNIOR, P.G.P.; LAGO, L.A.; VERÇOSA JÚNIOR, D. HABERMEHL, G.G. Envenenamento botrópico. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, n.44, p.59-79, 2004.
- MÉNDEZ, M.C. Envenenamento botrópico. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. *Doenças de ruminantes e eqüinos*. Pelotas: Ed. Gráfica Universitária – UFPel, 1998, p. 451-458.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, DF, 1999.
- MIRTSCHIN, P.J. et al. Snake bites recorded by veterinary practices in Australia. *Aust. Vet.*, v.76, n.3, p.195-198, 1998.
- MORENO, E.; QUEIROZ-ANDRADE, M.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; TAVARES-NETO, J. Características clínicoepidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, n.1, p.15-21, 2005.

- MORS, W.B. Looking at the origins. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v.49, n.5/6, p.310-314, 1997.
- MORS, W.B. et al. 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- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur. J. Immunol.*, v.26, p.2000-2005, 1996.
- NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE, M. Clinical and hematological alterations in dogs during experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom and treated with antiophidic serum. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v.12, n.2, p.285-296, 2006.
- NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; SALDARRIAGA, M.; OSORIO, R.G.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; DÍAZ, A. QUINTANA, J.C. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.37, p.969-977, 2004.
- ODELL, G.V. et al. Citrate inhibition of snake venom proteases. *Toxicon*, v.36, p.1801-1806, 1998.
- OLIVEIRA, M. M. V. Serpentes venenosas. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, n.28, p.1-52, 1999.
- OLIVEIRA, R.B.; RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Fatores associados à incoagulabilidade sanguínea no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, n.6, p.657-663, 2003.
- OLIVEIRA, N.J.F. *Avaliação clínica e laboratorial de bovinos experimentalmente inoculados com veneno de Bothrops alternatus bruto e iodado*. 2005. 180p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária da UFMG
- OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.M.; MESA, M.B. et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriehis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attendend in a university hospital. *Toxicon*, v.40, n.8, p.1107-1114, 2002.
- PEREIRA, N.A.; PEREIRA, B.M.R.; NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; MORS, W.B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes: protection against Jararaca venom by isolated constituents. *Planta Med.*, n.60, p.99-100, 1993
- PÉREZ, O.C.A.; KOSCINCZUK, P.; TEIBLER, P. et al. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas em almohadilla plantar Del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. *Toxicon*, v.36, n.8, p.1165-1172, 1998.
- PICOLO, G.; CHACUR, M.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.35, n.10, p.1221-1228, 2002.
- PREMAWARDHENA, A.P.; SILVA, C.E.; FONSEKA, M.M.D.; GUNATILAKE, S.B.; SILVA, H.J. Low dose subcutaneous adrenaline to prevent acute reactions to antivenom serum in people bitten by snakes: randomized, placebo controlled trial. *B.M.J.*, v.318, p.1041-1043, 1999.
- PUORTO, G.; SALOMÃO, M.G.; LAPORTA-FERREIRA, I.L. The quantity

- of venom produced and injected by juvenile and adult *Bothrops jararaca* (VIPERIDAE, CROTALINAE). *The Snake*, v.27, p.140-144, 1996.
- QUIROGA, M. AVILA-AGÜERO, M.I.; FAINGEZICHT, I. Abscess secondary to facial snakebite. *J. Venom. Toxins incl. Trop. Dis.*, v.6, n.2, 2000.
- RAM, A.; DAS, M.; GHOSH, B. Curcumin attenuates allergen-induced airway hyperresponsiveness in sensitized guinea pigs. *Biol. Pharm. Bull.*, v.26, n.7, p.1021-1024, 2003.
- RASMUSSEN, H.B.; CHRISTENSEN, S.B.; KVIST, L.P.; KARAZMI, A. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. *Planta Med.*, v.66, p.396-398, 2000.
- RIBEIRO, L.A.; ALBUQUERQUE, M.J.; PIRES DE CAMPOS, V.A.F.; KATZ, G.; TAKAOKA, N.Y.; LEBRÃO, M.L.; JORGE, M.T. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. *Ver. Ass. Med. Brasil*, v.44, n.4, p.312-318, 1998.
- RIBEIRO, L.A., JORGE, M.T. Acidente por serpente do gênero *Bothrops*: série de 3139 casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30, n.6, p.1-10, 1997.
- ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F.D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). *Rev. Bras. Zool.*, n.22, v.2, p.383-393, 2005.
- ROODT, A.R.; VIDAL, J.C.; DOLAB, J.A. et al. Terapeutica en el envenenamiento por serpientes: generalidades y tratamientos. *Rev. Med. Vet.*, v.78, n.1, p.64-71, 1996.
- ROSENFELD, G. Syntomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E.E. (ed). *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic Press, 1971, v.2, p.345-403.
- ROSENFELD, G. Envenenamento por picadas de animais peçonhentos. In: CONSEMELI, W.; SALDANHA, R.V.; SERRO AZUL, L.G.C.C. *Terapêutica Clínica*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1979
- ROSENFELD, G.; KELEN, E.M.A.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. I. Classification in different types and activities. *Mem. Inst. Butantan*, v.30, p.103-116, 1960.
- ROSENFELD, G.; HAMPE, O.G.; KELEN, E.M.A. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms: determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan*, v.29, p.143-163, 1959.
- ROSENFELD, G.; LANGLADA, F.G. Ação da Isoxsuprina (Duvadilan) sobre a ulceração dérmica e a sobrevida de camundongos inoculados com veneno de *Bothrops jararaca*. *Ciência e Cultura*, v.16, p.217, 1964.
- ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S.; MORAES, V.L.G. Brazilian medicinal plants: a rich source of immunomodulatory substances. *J. Braz. Assoc. Advanc. Sc.*, v.49, n.5/6, p.395-401, 1997.
- RUCAVADO, A.; NUÑEZ, J, GUTIÉRREZ, J.M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int. J. Exp. Path.*, v.79, p.245-254, 1998.
- SALEHEEN, D.; ALI, S.A.; ASHFAQ, K.; SIDDIQUI, A.A.; AGHA, A.; YASINZAI, M.M. Latent activity of curcumin against

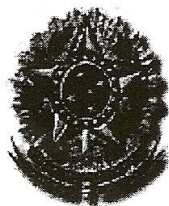
- Leishmaniasis *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.*, v.25, n.3, p.386-389, 2002.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SANO-MARTINS, I. S. Hematological disturbances induced by *Bothrops* venom. *Mem. Inst. Butantan.* v.52, p. 39-40, 1990 (Suplemento).
- SANO-MARTINS, I.S., et al. Reliability of the simple 20 minute whole blood clotting test (WBCT20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by *Bothrops* snakes. *Toxicon*, v.32, p.1045-1050, 1994.
- SANO-MARTINS, I.S.; SANTORO, M.L. ; CASTRO, S.C.B. et al. Platelet aggregation in patients bitten by the brazilian snake *Bothrops jararaca*. *Thromb. Res.*, v.87, n.2, p.183-195, 1997.
- SANO-MARTINS, I. S., SANTORO, M. L., MORENA, P. et al. Hematological changes induced by *Bothrops jararaca* venom in dogs. *Braz. Jour. of Med. and Biol. Res.* v.28, p.303-312, 1995.
- SANTORO, M.L.; SANO-MARTINS, I.S. Different clotting mechanisms of *Bothrops jararaca* snake venom on human and rabbit plasmas. *Toxicon*, v.31, n.6, p.733-742, 1993.
- SANTOS, M.M.B. *Avaliação clínica e laboratorial de cães tratados com flunixin meglumine, Curcuma longa L. e soro antitoxico após envenenamento botrópico experimental (Bothrops alternatus Duméril, 1854)*. 2002. 86p. Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinárias) Escola de Veterinária da UFMG
- SANTOS, E.P.; RESENDE, E.S.; SILVEIRA, P.V.P.; FAGUNDES, D.J. Efeitos do soro antitoxico nas alterações hemodinâmicas induzidas em cães pelo veneno de *Bothrops moojeni*. *Acta Cir. Bras.*, v.15, n.1, p.1-13, 2000.
- SANTOS, M.M.B.; MELO, M.M.; JACOME, D.O.; FERREIRA, K.M.; HABERMEHL, G.G. Avaliação das lesões locais de cães envenenados experimentalmente com *Bothrops alternatus* após diferentes tratamentos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.5, p1-11. 2003a.
- SANTOS, M.M.B.; MELO, M.M.; JACOME, D.O.; FERREIRA, K.M.; OLIVEIRA, N.J.F., ALZAMORA FILHO, F. Avaliação de diferentes tratamentos sobre as alterações hemostáticas após envenenamento botrópico (*Bothrops alternatus*) em cães. *Biosc. J.*, v.19, n.3, p.123-130, 2003b.
- SASAKI, Y. et al. Effects of *Curcuma* drugs on vasomotion in isolated rat aorta. *Biol. Pharm. Bull.*, v.26, n.8. p.1135-1143, 2003.
- SCHLAGE, C.; MABULA, C.; MAHUNNAH, R.L.A.; HEINRICH, M. Medicinal plants of the washambaa (Tanzania): documentation and ethnopharmacological evaluation. *Plant. Biol.*, v.2, p.83-92, 2000.
- SCHVARTSMAN, S. *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. São Paulo: Sarvier, 1992. 288p.
- SEEGERS, W.H.; OUYANG, C. Snake venoms and blood coagulation. In: LEE, C.Y. (ED.) *Snake venoms, Handbook of experimental pharmacology* 52, Berlin: Springer, 1979, p.684-750.
- SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S. ; CUNHA, A.B. et al. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops*

- insularis* (Jararaca Ilhoa) snake venom. *Toxicon*, v.28, n.3, p.261-273, 1990.
- SHISHODIA, S.; POTDAR, P.; GAIROLA, C.G.; AGGARWAL, B.B. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B α kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1. *Carcinogenesis*, v.24, n.9, p.1269-1279, 2003.
- SILVA JUNIOR, P.G.P. *Avaliação clínica e laboratorial de case tratados com extrato de Kalanchoe brasiliensis e soro antibotrópico após o envenenamento botrópico experimental (Bothrops alternatus Duméril, 1854)* Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG; 2003. 133p. (Dissertação, Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinárias).
- SINGH, G.; SINGH, O.P.; MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian Curcuma species. *Prog. Crystal Growth and Character.* V.75, p.75-81, 2002.
- SONG, E.; CHO, H.; KIM, J. KIM, N. ; AN, N.; KIM, J.; LEE, S.; KIM, Y. Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity *in vitro* from *Curcuma longa*. *Planta Med.*, v.67, p.876-877, 2001.
- SOERENSEN, B. *Animais peçonhentos*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. 138p.
- SOERENSEN, B.; BARROS, A.S. ; NETO, L.Z. et al. Aspecto clínico e laboratorial do envenenamento botrópico e crotálico em bovinos. *Unimar Ciências*, v.4, p.28-33, 1995.
- SOERENSEN, B.; BADIZ, F.P. ; CHRISTOVÃO, F.G. et al. Importância da urgência na soroterapia dos acidentes por animais peçonhentos. Estudo experimental em camundongos. *Unimar Ciências*, v.2, p.25-29, 1993.
- SOUTH, E.H.; EXON, J.H.; HENDRIX, K. Dietary curcumin enhances antibody response in rats. *Immunoph. Immunotoxicol.*, v.19, n.1, p.105-119, 1997.
- SRIMAL, R.C.; DHAWAN, B.N. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.25, p.447-452, 1997.
- TAKAHIRA, R.K. *Alterações hemáticas, hematológicas e bioquímicas de cães no envenenamento experimental por Bothrops jararaca (Wied, 1824) e Bothrops newiedii Wrangler, 1824*. 1996. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP.
- TAKAHIRA, R.K. *Perfil hematológico, hemostático, bioquímico e histopatológico do envenenamento experimental de cães por Bothrops alternatus Duméril, 1854 e Bothrops moojeni Hoge, 1966*. 1999. 195f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Universidade Estadual Paulista.
- TANIGAWA, M.; MATUYAMA, M.; SUGIKI, M. et al. Clearance and distribution of haemorrhagic factor purified from *Bothrops jararaca* venom in mice. *Toxicon*, v.32, n.5, p.583-593, 1994.
- TENNANT, B.C. Hepatic function. In : KANEKO, J.J. ; HARVEY, J.W. ; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press : San Diego, 1997, p.327-352.
- TREBIEN, H.A.; CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents actions*, v.26, p.292-300, 1989.

- WEN, F.H. Ineficácia do antiveneno na reversão do edema e ulceração dérmica em pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops*. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 6, 2000. São Pedro. *Anais...*São Pedro: Cruzeiro, 2000, p.78-81.
- WEN, F.H. Soroterapia. In: CARDOSO, J.L.C. et.al. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier: São Paulo, 2003, cap.37, p.380-393.
- WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*, v.45, p.951-967, 2005.
- WHITE, J.; WARREL, D.; EDDLESTON, M. CURRIE, B.J.; WHYTE, I.M.; ISBISTER, G.K. Clinical toxinology - where are we now? *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, n.41, 2003, p.263-276.
- VALENÇA, R.C. Study of the hemorrhagin process induced by the venom of *Bothrops erythromelas*. *J. Venom. Anim. Toxins*, v.5, n.1, p.100, 1999.
- VIANA, J. A. *Efeito da dexametasona sobre a ulceração dérmica experimental causada pelo veneno botrópico em cães (Bothrops moojeni, HOGE, 1965)*. Belo Horizonte: UFMG, 1983. 29p. (Dissertação, Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinárias).
- VILLARROEL, M.S.; ZELANTE, F.; ROSA, R.R. et al. Padronização da atividade necrosante dos venenos botrópicos e da potência antinecrosante do antiveneno de *Bothrops jararaca*. *Mem. Inst. Butantan*, v.42/43, p.345-355, 1978/79.
- XIA, X.; PAN, Y.; ZHANG, W.; CHENG, G.; KONG, L. Ethanolic extracts from *Curcuma longa* attenuates behavioral, immune, and neurendocrine alterations in rat chronic mild stress model. *Biol. Pharm. Bull.*, v.29, n.5, p.938-944, 2006.
- YAMANOUYE, N.; BRITTO, L.R.G.; CARNEIRO, S.M.; MARKUS, R.P. Control of venom production and secretion by sympathetic outflow in the snake *Bothrops jararaca*. *J. Exp. Biol.*, n.200, p.2547-2556, 1997.
- ZINGALI, R.B.; FRANCISCHETTI, I.M.; CARLINI, C.R. et al. Biochemical and pharmacological screening of snake (*Bothrops*) venoms. Characterization of components acting on blood coagulation and platelet aggregation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.21, n.4, p.763-765, 1988.

9. APÊNDICES

VALORES DE REFERÊNCIA	
Tempo de coagulação	341,17 ± 136, 16s
Tempo de protrombina	6,93 ± 2,90s
Tempo de tromboplastina parcial ativada	9,33 ± 1,85s
Plaquetas	279,96 ± 124,92/mm ³
Uréia	48,36 ± 13,87mg/dl
Creatinina	1,01 ± 0,20mg/dl
Alanina aminotransferase (ALT)	20,07 ± 8,36U/ml
Aspartato aminotransferase (AST)	18,01 ± 7,07U/ml
Creatina fosfotransferase (CK)	41 ± 61,42U.I./l
Hemácias	5,44 ± 0,55 x 10 ⁶ /mm ³
Hematócrito	34,00 ± 2,88%
Hemoglobina	11,59 ± 1,16g/dl
Volume globular médio (VGM)	62,66 ± 2,81µ ³
Hemoglobina globular médio (HGM)	21,58 ± 1,23pg
Concentração de hemoglobina globular média (CHGM)	34,18 ± 1,17%
Leucócitos	5528,62 ± 1948,95/mm ³
Neutrófilos	2746,70 ± 1433,92/mm ³
Bastonetes	71,57 ± 25,77/mm ³
Linfócitos	3411,82 ± 1258,53/mm ³
Basófilos	27,44 ± 7,7/mm ³
Monócitos	60,43 ± 31,97/mm ³



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **003/05** relativo ao projeto intitulado "Avaliação clínica e laboratorial de coelhos experimentalmente intoxicados por veneno de *Bothrops alternatus* e tratados com ar-turmerone e isso curcuminol", que tem como responsável Marília Martins Melo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado em reunião de **04.05.2005**.

Este certificado expira-se em **04.05.2010**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **003/05** related to the project entitled "Clinical and laboratorial evaluations in rabbits envenomated with *Bothrops alternatus* venom and treated with ar - turmerone e isso - curcuminol", under the supervision Marília Martins Melo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)** and was approved in **04.05.2005**.

This certificate expires in **04.05.2010**.

Belo Horizonte, 04 de maio de 2005


Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE
PRESIDENTE DO CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)-
Email – cetea@prpq.ufmg.br